

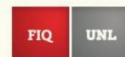


## MICRORREACTORES CONTINUOS

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE  
NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA  
LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL

**INSTITUTO DE CATÁLISIS  
Y PETROQUÍMICA**  
(INCAPE, FIQ, UNL – CONICET)

Autor: Lic. Antonella Giorello  
Directora: Dra. Laura Gutierrez  
Codirectora: Dra. María Alicia Ulla



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
SANTA FE, ARGENTINA





UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la  
obtención del Grado Académico de: Doctor en Química

En el campo de Nanotecnología

---

**Microrreactores continuos: Una alternativa para la síntesis de  
nanopartículas con aplicaciones para la remediación y el control  
ambiental**

---

Instituto de Catálisis y Petroquímica

(INCAPE, FIQ, UNL – CONICET)

Autor: Lic. Antonella Giorello

Directora: Dra. Laura Gutierrez

Codirectora: Dra. María Alicia Ulla

Jurados: - Dr. Urteaga, Raúl

- Dra. Leyva de Guglielmino, Ana Gabriela

- Dra. Acosta, Delicia Ester

~ Año 2018 ~





*Dedicada a mis cuatro abuelos:*

*la abuela Angela,*

*la abuela Emma,*

*el Tata y*

*el abuelo Ignacio.*



# Agradecimientos

---

En primer lugar quiero agradecer a Laura Gutierrez y María Alicia Ulla, mis directoras, por confiar en mí y dado la libertad y todo lo que necesité para realizar este trabajo.

Quiero agradecer a Jesús Santamaría por recibirme en el INA durante mi estancia en Zaragoza. Y a Manuel Arruebo, Víctor Sebastian y José Luis Hueso por dirigirme.

A Carolina Veaute por ayudarme con los ensayos bactericidas en la FBCB. A Claudio Berli quien diseñó y fabricó los micromezcladores en INTEC, utilizados en la Tesis. A Claudia Taleb y Graciela Olmos del ITC por toda la ayuda que me dieron.

Hakan, Sara, Ana, Marimar, Carlos, Tiki, Magda, Maciej, Irene, Laura U., Laura L., Ángela y Marta, que se convirtieron en mis amigos y familia durante el año y medio que estuve lejos de casa.

A toda la gente de Fisicoquímica. A Esteban con quién compartí parte de este trabajo. A Leti quien desde el principio estuvo para todas mis dudas. Leo con quien compartí un millón de carcajadas acá y en el viejo mundo. A Mili mi amiga “bio” en un mundo lleno de ingenieros. Albano y Ane, “Mis amigos (ingenieros) de l’Alta Casa”, que estuvieron siempre para darme el empujón que me hacía falta.

A Pablo con quien me volví a cruzar en el doctorado y compartimos largas charlas, aconsejándonos y motivándonos el uno al otro.

Luli, Juli, Agus y Delfi, “Las chicas de Paraná”, con ellas descubrí que en equipo se trabaja mejor.

Belu, Emi, Javi, Christian, Lea, Horacio y Tincho, “Los descuas”, ellos me ayudan a ver la vida de otra forma y me enseñan que crecer no tiene nada de aburrido.

Ro y Dolo, mis “Misisipi”, gracias por regalarme su amistad y su hermoso corazón.

Carla, Mili, Miri, Lia y Aye, “las amigas de la escuela”. Venimos compartiendo juntas cada paso, a veces de cerca y otras no tanto, pero estamos. En especial, gracias a Aye por diseñar las carátulas de esta Tesis.

A Anahí, mi amiga de toda la vida y con quien la distancia no significa nada.

Nico, Flor y Fran, mis hermanos, que llueve o truene, están presentes y pese a todo somos incondicionales.

A Carla, mi cuña querida, gracias por estar, por ser parte de mi vida y compartir la locura que tenemos.

Eva y Bianca, mis dos gorditas hermosas. Llegaron para sacarme una sonrisa cada vez que las veo.

Osvaldo, Mary, Lore, Germán, Pato, Juli y Viole, gracias por recibirme en su familia y pasar a ser parte de mí.

Abuela Ángela, gracias infinitas por todas las hermosas charlas y consejos.

Mami y Papi, gracias! Por ustedes soy quien soy y llegué donde llegué.

Bernardo, gracias por elegirme, gracias por compartir tus días y sobre todo gracias por bancarme durante toda esta etapa.

Una Tesis no se hace sola. Es un trabajo muy duro, con momentos de satisfacciones y con momentos difíciles. En cada paso, durante estos 5 años, estuve muy bien acompañada por todos ustedes y gracias a eso logré llegar!

GRACIAS!!

# Índice

---

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 1 : Introducción .....</b>	<b>7</b>
1.1. Nanotecnología y Nanociencia .....	7
1.2. Síntesis de nanopartículas .....	8
1.2.1. Top-down y Bottom-up.....	8
1.2.2. Nucleación y crecimiento .....	9
1.2.3. Síntesis en sistema continuo .....	14
1.2.4. Síntesis “verde” de nanopartículas.....	19
1.3. Nanopartículas para la remediación y control ambiental .....	21
1.3.1. Nanopartículas con propiedades antimicrobianas.....	21
1.4. Nanopartículas de plata y cobre.....	24
1.4.1. Síntesis de nanopartículas de plata y cobre .....	24
1.4.2. Actividad bactericida de las nanopartículas de plata y cobre .....	28
1.5. Objetivos.....	31
1.5.1. Objetivos específicos .....	31
1.6. Bibliografía .....	32
<b>Capítulo 2 : Experimental .....</b>	<b>45</b>
2.1. Síntesis de nanopartículas .....	45
2.1.1. Síntesis en sistemas discontinuos.....	45
2.1.2. Síntesis en sistemas continuos .....	46
2.2. Caracterización .....	50

2.2.1.	Espectroscopia de absorción UV-visible (UV-vis) .....	50
2.2.2.	Microscopía electrónica de transmisión.....	51
2.2.3.	Dispersión de luz dinámica .....	52
2.3.	Diseño experimental.....	54
2.4.	Actividad bactericida .....	56
2.4.1.	Modelo de Bacteria.....	56
2.4.2.	Medios de cultivo.....	56
2.4.3.	Actividad bactericida .....	58
2.4.4.	Análisis de resultados de actividad bactericida .....	58
2.5.	Bibliografía .....	59
<b>Capítulo 3 : Nanopartículas de plata .....</b>		<b>63</b>
3.1.	Síntesis en sistema discontinuo y continuo.....	63
3.2.	Influencia de la temperatura y la relación de reactivos .....	65
3.3.	Evaluación de la estabilidad luego de largos períodos de almacenamiento. ....	72
3.4.	Conclusiones parciales.....	78
3.5.	Bibliografía .....	80
<b>Capítulo 4 : Nanopartículas de cobre .....</b>		<b>83</b>
4.1.	Análisis de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) de las CuNp.....	83
4.2.	Reductor $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ .....	87
4.2.1.	Síntesis en sistema discontinuo .....	87
4.2.1.1.	Modificaciones a partir del protocolo de referencia .....	91
4.2.2.	Síntesis en sistema continuo .....	93
4.2.3.	Conclusiones parciales.....	99

4.3.	Reductor $N_2H_4$ .....	99
4.3.1.	Síntesis en sistema discontinuo .....	100
4.3.1.1.	Evaluación de diferentes precursores .....	100
4.3.1.2.	Efecto del tamaño de partículas sobre la estabilidad coloidal.....	102
4.3.1.3.	Influencia de la concentración de PVP .....	106
4.3.1.4.	Influencia del tiempo de agitación .....	108
4.3.2.	Síntesis en sistema continuo .....	111
4.3.2.1.	Optimización del flujo segmentado en micromezclador de canal recto.....	112
4.3.2.2.	Síntesis de CuNp con micromezclador de canal recto .....	113
4.3.2.3.	Optimización del flujo segmentado en micromezclador de canal en serpentina .....	117
4.3.2.4.	Síntesis de CuNp con micromezclador de canal en forma de serpentina .....	119
4.3.3.	Conclusiones parciales.....	120
4.4.	Reductor dopamina .....	121
4.4.1.	Síntesis en sistema discontinuo .....	123
4.4.1.1.	Modificaciones a partir del protocolo de referencia .....	126
4.4.2.	Síntesis en sistema continuo .....	127
4.4.3.	Conclusiones parciales.....	130
4.5.	Reductor ácido ascórbico .....	130
4.5.1.	Síntesis en sistema discontinuo .....	130
4.5.1.1.	Síntesis a partir del protocolo de referencia .....	130
4.5.1.2.	Modificaciones a partir del protocolo de referencia .....	134
4.5.1.3.	Evaluación de diferentes precursores .....	138
4.5.2.	Conclusiones parciales.....	140
4.6.	Bibliografía .....	141

<b>Capítulo 5 : Diseño experimental .....</b>	<b>149</b>
5.1. Síntesis en sistema discontinuo .....	149
5.1.1. Diseño factorial de nivel dos .....	149
5.1.2. Influencia del orden de agregado de reactivos .....	150
5.1.3. Ensayos del diseño experimental .....	152
5.1.4. Resultados del diseño experimental.....	153
5.1.5. Análisis estadístico del diseño experimental.....	157
5.1.6. Estabilidad en solución de las CuNp en función del tamaño de partículas ...	165
5.2. Síntesis en sistema continuo .....	168
5.2.1. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de salida lateral ....	168
5.2.2. Síntesis de CuNp en sistema continuo de fase segmentada .....	172
5.2.3. Síntesis de CuNp en sistema continuo de fase continua .....	176
5.3. Conclusiones parciales.....	179
5.4. Bibliografía .....	181
<b>Capítulo 6 : Actividad bactericida .....</b>	<b>187</b>
6.1. Actividad bactericida AgNp.....	187
6.2. Actividad bactericida CuNp.....	190
6.2.1. Reductor $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ .....	190
6.2.2. Reductor dopamina .....	192
6.3. Conclusiones parciales.....	194
6.4. Bibliografía .....	196
<b>Capítulo 7 : Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>201</b>
7.1. Conclusiones .....	201



7.1.1.	Contexto.....	201
7.1.2.	Nanopartículas de plata.....	201
7.1.3.	Nanopartículas de cobre.....	201
7.1.4.	Conclusiones finales.....	204
7.2.	Perspectivas.....	204



## Resumen

---

Para evaluar los potenciales beneficios del uso de microrreactores para la síntesis continua de nanopartículas metálicas, se seleccionó la producción de plata y cobre: AgNp y CuNp respectivamente, ambos metales con actividad bactericida y con potenciales aplicaciones en remediación y control ambiental.

La tesis se organiza en 5 capítulos. En el primer capítulo, a modo de introducción, se presentan los temas a tratar. Se describe de manera general a la nanotecnología y la síntesis de nanomateriales. Se detallan los diferentes métodos de preparación de nanopartículas, introduciendo específicamente los sistemas de síntesis en continuo. Se presenta bibliografía sobre la síntesis y propiedades bactericidas de AgNp y CuNp, haciendo hincapié en la importancia de la aplicación de metodologías de síntesis compatibles con el ambiente.

El Capítulo 2 puntualiza las metodologías utilizadas para la síntesis de AgNp y CuNp y se especifican los microrreactores utilizados. Se describen las diferentes técnicas de caracterización aplicadas para evaluar las nanopartículas obtenidas y se presenta el protocolo para la determinación de la actividad bactericida.

El Capítulo 3 se basa particularmente en el estudio de la síntesis de AgNp. A partir de búsqueda bibliográfica se presenta un protocolo de síntesis compatible con el ambiente que emplea  $\text{AgNO}_3$  como sal precursora de Ag, glucosa como agente reductor y almidón como agente estabilizante. Se realiza un estudio comparativo de las síntesis en sistema discontinuo y continuo, analizando la influencia de la temperatura y relación de reactivos en la calidad y estabilidad de las nanopartículas obtenidas.

El Capítulo 4 estudia diferentes métodos de síntesis de CuNp dividido en cuatro secciones. Cada una trata un protocolo de síntesis diferente seleccionados de la bibliografía. La primera sección se basa en la síntesis de CuNp en medio orgánico (dietilenglicol) a partir de  $\text{CuSO}_4$  como sal precursora,  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  como agente reductor y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y polivinilpirrolidona (PVP) como agentes protectores. La segunda, parte de un protocolo en medio acuoso que utiliza  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  como precursor,  $\text{N}_2\text{H}_4$  como reductor y PVP como estabilizante. La tercera sección

plantea la síntesis de CuNp empleando  $\text{CuCl}_2$  y dopamina (DOPA) como reductor y agente protector. Y finalmente, la cuarta sección plantea el un protocolo con  $\text{CuCl}_2$  y ácido ascórbico (AA) como agente reductor y protector. En los cuatro casos se abordaron distintas modificaciones con el objetivo de realizar un estudio comparativo de las síntesis en discontinuo y continuo analizando diferentes variables.

En el Capítulo 5 se aplica un diseño experimental para determinar los factores más influyentes sobre la síntesis de CuNp basada en el uso de AA como agente reductor. Las diferentes experiencias del diseño seleccionado se evalúan en sistema discontinuo. Luego, con la información obtenida se lleva a cabo la síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado y de fase continua.

En el Capítulo 6 se analiza la aplicación de las AgNp y las CuNp como bactericidas contra cultivos de *Escherichia coli*.

Finalmente, en el Capítulo 7 se resumen las conclusiones más relevantes obtenidas durante la Tesis Doctoral en Química.

## Abreviaturas

---

AA: ácido L-ascórbico

ADHA: ácido dehidroascórbico

AgNp: nanopartículas de plata

CFU: colony forming unit

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamomio

CuNp: nanopartículas de cobre

DE: diseño experimental

DEc: muestras del diseño experimental correspondientes a los valores medios

DLS: dynamic light scattering

DOPA: dopamina

IPD: índice de polidispersidad

PVP: polivinilpirrolidona

r: relación molar entre el precursor metálico y el agente reductor

rq: relación de caudales (ml/h) entre la fase acuosa y la fase oleosa

SPR: surface plasmon resonance

TEM: transmission electron microscopy

[AA]: concentración de ácido ascórbico

[CTAB]: concentración de bromuro de cetiltrimetilamomio

[PVP]: concentración de polivinilpirrolidona



# MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES  
PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



## 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

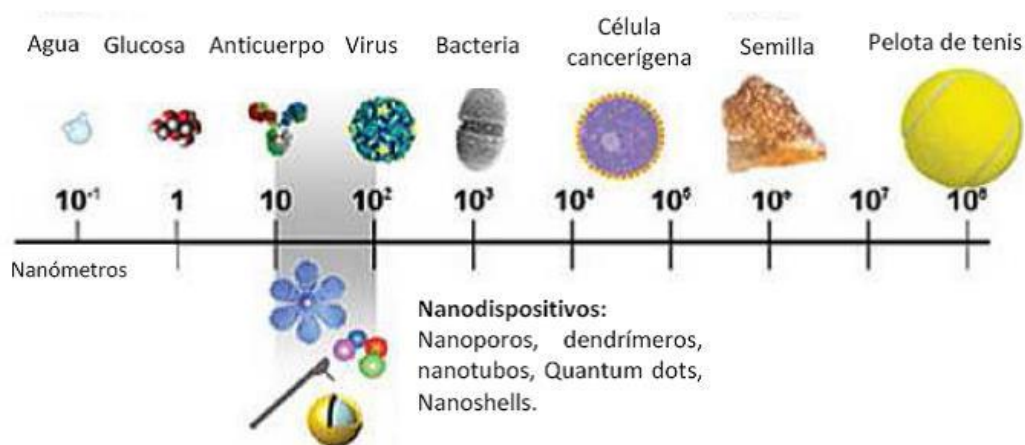




## Capítulo 1 : Introducción

### 1.1. Nanotecnología y Nanociencia

El concepto de *Nanotecnología* fue introducido por R. Feynman en su conferencia “There’s plenty of room at the bottom” en 1959 [1] y desde entonces ha habido una revolución en el desarrollo de la física, química y biología manipulando la materia a nivel molecular y atómico [2]. El campo de la *Nanotecnología* se define como el estudio, diseño, creación, síntesis y manipulación de materiales, equipos y sistemas funcionales para la fabricación de dispositivos, de tal forma que alguna de sus dimensiones características sea inferior a 100 nm (Figura 1.1). De esta manera se desarrollan e investigan materiales que adquieren nuevas propiedades y funciones [3] como resultado de la reducción dimensional por debajo de un valor umbral determinado (100 nm o menos).



**Figura 1.1. Escala nanométrica representando biomoléculas, organismos y objetos.**  
(Adaptado de la fuente: Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, National Cancer Institute).

La *Nanociencia*, por otro lado, se define como la ciencia que permite la medición, manipulación y caracterización de materiales y sistemas a escala nanométrica para comprender mejor la estructura y funcionamiento a nivel macroscópico [2]. La Nanociencia es un campo multidisciplinar que engloba a la química, física, biología, ingeniería y la ciencia de materiales.

## 1.2. Síntesis de nanopartículas

En los últimos 10 años las inversiones en el área de Nanotecnología ha aumentado notablemente y las proyecciones indican que la producción mundial responde a incrementos exponenciales [4]. El concepto de nanoescala ha tomado interés y relevancia en numerosas áreas de la ciencia, de las cuales debemos tener en cuenta y destacar la microbiología y la catálisis que juegan un rol muy importante en muchas industrias tales como la petroquímica, la química fina, la farmacéutica, la alimenticia y en el tratamiento de efluentes contaminantes líquidos y gaseosos. La Nanociencia y la Nanotecnología han encontrado importantes aplicaciones en biotecnología y en medicina. Se estima que la producción global de la ingeniería en nanomateriales para la biotecnología alcanzó 1 Tn/año en el 2010 y las predicciones indican que en el 2020 será de 10 Tn/año [5].

Actualmente, para dar respuesta a estas demandas, la atención no sólo se enfoca en la calidad y características de los nanomateriales, sino también en la producción de los mismos. Más aún, la síntesis y fabricación de nanomateriales es uno de los campos más activos dentro de la nanociencia. No obstante, los avances dependen principalmente de la capacidad para sintetizar nanoestructuras de propiedades controladas. Es bien sabido que las propiedades de los nanomateriales dependen en gran medida del tamaño, forma, composición, morfología y estructura cristalina. En consecuencia, se han planteado varios enfoques para controlar estos parámetros y, por lo tanto, cumplir con los requisitos necesarios para las diversas aplicaciones.

### 1.2.1. Top-down y Bottom-up

La preparación de nanopartículas se puede dividir en dos grandes ramas. Por un lado, la denominada *top-down*, basada en la ruptura física del material masivo hasta obtener unidades de forma y tamaño deseados. Esto implica la preparación de nanopartículas a partir de materiales sólidos de mayor tamaño y, en general, comprende procesos físicos o mecánicos como molienda, tallado o corte para dar la forma y tamaño deseado. Estos procesos generan desperdicio de material y están limitados por la resolución de los equipamientos empleados, por lo que los tamaños obtenidos son restringidos. Ejemplos de este tipo de tecnología incluyen los diversos tipos de litografías (fotolitografía,

litografía por haz de iones, litografía electrónica o de rayos X) y tratamientos de sólidos como molienda, corte, grabado y rectificado [6].

La otra rama, que es intrínsecamente química, se denomina *bottom-up* e implica generar nanomateriales a partir de la unidad de material (átomo o molécula), alcanzando el tamaño deseado controlando el reordenamiento de las unidades de formación. A través de estos procesos se producen menos desperdicios y el tamaño de las nanopartículas es siempre menor que las obtenidas mediante procesos top-down. Las nanoestructuras se logran mediante reacciones químicas y sus partes constituyentes se mantienen unidas mediante enlaces covalentes fuertes. Estos procesos consisten en el autoensamblaje de especies moleculares mediante reacciones químicas controladas, por lo que se llevan a cabo en una fase fluida, a diferencia de los métodos top-down que se realizan en fase sólida. Al comparar ambos procesos, la técnica bottom-up resulta más eficiente y flexible para la síntesis de una gran variedad de nanomateriales con un buen control de la forma, tamaño, morfología, estructura y propiedades superficiales. A su vez, los procesos de síntesis bottom-up pueden realizarse en fase líquida o en fase de gas (o vapor). En cualquier caso, la unidad de formación del producto nanoestructurado (átomo o molécula) es generado en la fase móvil (fase fluida). De esta manera, controlando las condiciones de síntesis (temperatura, presión, atmósfera, concentración inicial, tipo de reactivo, tiempo de residencia, tipo y concentración de aditivos, etc.) se pueden obtener diferentes formas de nanomateriales como esferas huecas, esferas rellenas, core-shell, tubos, varillas, placas de dos y tres dimensiones con composición deseable, entre otras. Ejemplos de síntesis en fase líquida son la precipitación, sol-gel, hidrotermal, microemulsión y deposición electroquímica [6].

### 1.2.2. Nucleación y crecimiento

Las síntesis de nanopartículas metálicas mediante sistemas bottom-up a partir de unidades elementales, ya sean cationes o átomos, permite un mejor control del ensamblado de las unidades, asistido en general por moléculas o iones que interactúan con las partículas restringiendo su crecimiento y/o aglomeración. El control de la síntesis por esta vía es principalmente cinético, y el mecanismo de formación de nanopartículas puede separarse en dos procesos básicos, nucleación y crecimiento [7].

La nucleación es el proceso por el cual se forma una nueva fase en el seno de otra preexistente y a partir de la cual, además, se forma una superficie.

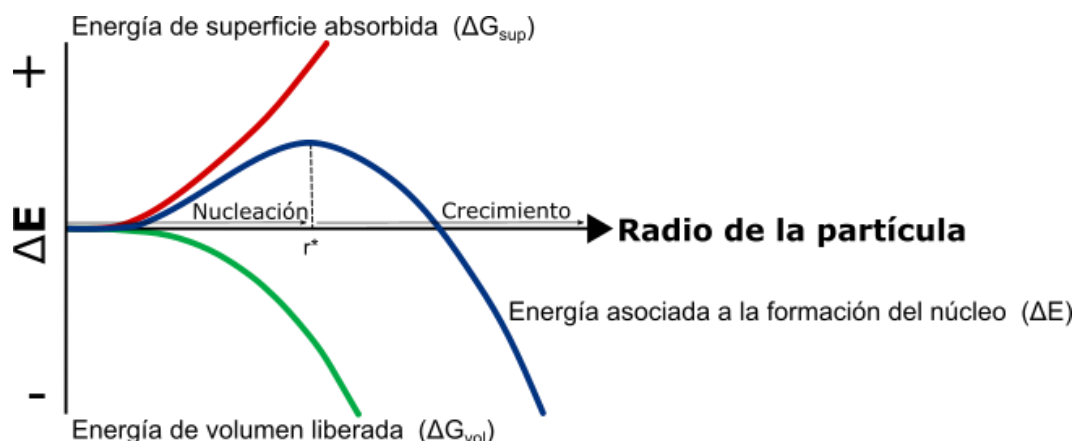
Por lo tanto, en el proceso de solidificación se dan dos fenómenos de transferencia de energía:

- Los átomos que pasan de estado líquido al sólido liberan energía ( $\Delta G_{vol}$  asociada a la variación de energía libre de cohesión por unidad de volumen,  $\Delta G_v$ ).
- Los átomos que forman la superficie del sólido absorben energía ( $\Delta G_{sup}$  relacionada a la tensión superficial,  $\gamma$ ).

La formación de núcleos se origina por fluctuaciones del sistema, donde la competencia entre el cambio de energía libre en volumen ( $\Delta G_{vol}$ ) y el cambio de energía libre para la formación de una superficie ( $\Delta G_{sup}$ ) determina la estabilidad de los núcleos frente a su propia disolución. Por ejemplo, para la formación de un núcleo esférico ideal la variación de energía ( $\Delta E$ ) se asocia a estos factores mediante la ecuación:

$$\Delta E = \Delta G_{vol} + \Delta G_{sup} = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad \text{Ec. 01}$$

La generación de volumen  $\Delta G_{vol}$  está relacionada a  $\Delta G_v$ , mientras que la la formación de superficie  $\Delta G_{sup}$ , dependiente de la  $\gamma$ , resulta un término “desestabilizante” para la formación de núcleos. Los núcleos pueden desarrollarse como tales una vez superado lo que se conoce como radio crítico de formación ( $r^*$ ). Para radios mayores a  $r^*$ , el costo energético de formación de superficie comienza a ser despreciable frente a la disminución de energía libre asociada a la formación en volumen del material (Figura 1.2) [7].

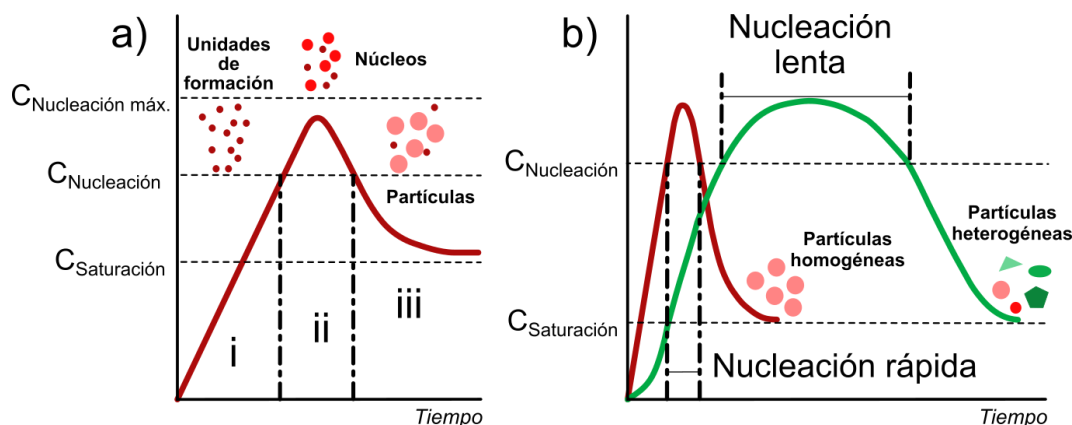


**Figura 1.2. Nucleación y crecimiento.** Cambio de energía asociada a la formación de una partícula en función del radio y sus contribuciones debidas a la energía de superficie y de volumen (adaptado de [7]).

Si bien no es posible conocer el radio crítico de un sistema determinado, es este valor el que separa los procesos de nucleación y crecimiento. Para  $r < r^*$  predomina la formación de núcleos, mientras que aquellos que no alcanzan un radio  $r^*$  se disuelven. Cuando  $r > r^*$ , el proceso determinante es el crecimiento de partículas. El control sobre la monodispersión de tamaño de las partículas debe comenzar en el período de la nucleación, donde la restricción de la ventana temporal en la cual se generan los núcleos, permite luego el crecimiento uniforme de las especies. Sin embargo, aún no se han logrado controlar completamente estos procesos, y el monitoreo de núcleos durante su formación aún requiere superar diversos desafíos experimentales [7].

Para la formación de nanopartículas, el modelo de LaMer [8] es el mecanismo de nucleación y crecimiento más aceptado. De acuerdo a este modelo, el proceso puede dividirse en tres: (i) generación de “unidades de formación” (monómeros, átomos), (ii) formación de núcleos y (iii) crecimiento (Figura 1.3-a). Una vez iniciada la reacción, la concentración de las unidades de formación aumenta progresivamente hasta superar valores de sobresaturación crítica ( $C_{\text{Nucleación}}$ ), incrementando la probabilidad de choques que lleven a la formación de núcleos. Esta formación ocurre de manera “explosiva”, rápidamente y en un lapso acotado de tiempo. La disminución de la sobresaturación del sistema detiene el proceso de nucleación ( $v_{\text{Nucleación}} = 0$ ) y los reactivos remanentes sólo aportan al crecimiento de las partículas, el cual está controlado por difusión. El control sobre el tamaño final de las partículas está dado entonces por la conjunción de tres

factores: la cantidad de los núcleos formados, la concentración remanente de reactivos y su difusión hacia las partículas [7].



**Figura 1.3. Nucleación y crecimiento.** a) Concentración de unidades de formación en solución en función del tiempo. (i) Generación de unidades de formación, (ii) nucleación y (iii) crecimiento. b) Procesos de nucleación rápida y lenta. En ambos gráficos el eje vertical corresponde a la concentración en solución de la concentración de las unidades de formación (adaptado de [7]).

La teoría de LaMer predice la obtención de sistemas monodispersos cuando los procesos de nucleación y crecimiento se producen en tiempo diferentes. Es decir, la velocidad de un proceso es nula mientras ocurre el otro proceso, y eso garantiza la formación de partículas con tamaño monodisperso (Figura 1.3-b). Por otra parte, la teoría considera que el crecimiento está controlado por la difusión de las unidades de formación en solución hacia las partículas, pero esto tampoco puede generalizarse ya que es posible que la reacción superficial de adición de unidades sea el paso limitante, especialmente cuando su incorporación implica la remoción de una molécula adsorbida.

Cuando el proceso de nucleación homogénea es lento (Figura 1.3-b), los reactivos se consumen de manera dispar, generando diferencias de velocidades de crecimiento de cada núcleo. Esta superposición de los procesos de nucleación y crecimiento genera una población de partículas polidispersa y con diferentes morfologías. La teoría de LaMer es un excelente punto de partida para el análisis de los procesos de formación de nanopartículas, pero en sistemas reales está condicionada a casos puntuales por lo que deben tenerse en cuenta diversos factores no contemplados en su modelo, para comprender el proceso [7].

En el caso de las síntesis de nanopartículas metálicas mediante reducción química, el mecanismo de nucleación aun no es claro. Sin embargo se postulan dos opciones, la reducción y agregación de los iones en disolución que generan núcleos sobre los que crecen las partículas, o bien la agregación de los iones en disolución con su posterior reducción. Este último caso consiste en un mecanismo de reducción autocatalítica en el que los núcleos metálicos reducen a los iones en su superficie, por lo que el proceso está condicionado por la reacción de adición de iones a la superficie más que por su difusión [7, 9].

Un fenómeno adicional que puede ocurrir en el seno de coloides metálicos es la reorganización de la superficie una vez formadas las nanopartículas. En el equilibrio, la velocidad de crecimiento y de disolución se igualan y aparece el efecto de “maduración de Ostwald”. Este es un proceso que implica el desarrollo de las partículas más grandes a expensas de la desaparición de las nanopartículas de menor tamaño, dando lugar a suspensiones con menor concentración de partículas de mayor tamaño [9].

Experimentalmente, lograr una separación entre las etapas de nucleación y crecimiento es difícil, por lo que generalmente se busca maximizar la diferencia de velocidades en cada paso de la formación de partículas. Por ejemplo, una estrategia apela a la síntesis en dos etapas, donde el crecimiento se realiza sobre semillas pre-formadas. El control de las velocidades relativas de estos dos procesos se consigue a partir del ajuste de los parámetros de síntesis, entre los que se incluyen precursor metálico, agente estabilizante, disolvente y condiciones de reacción. La mayor o menor reducibilidad del precursor metálico y el mayor o menor carácter reductor del agente reductor de la síntesis afectan a la velocidad del proceso de nucleación y, por lo tanto, al tamaño de partícula final. La temperatura es también un parámetro muy importante en la formación de nanopartículas, ya que la energía de activación para la etapa de nucleación en fase homogénea es generalmente mayor que la de la etapa de crecimiento. Por eso, de manera general, un incremento en la temperatura de síntesis suele suponer una disminución en el tamaño de partícula obtenido. Por último, el agregado de agentes estabilizantes, la cantidad y su naturaleza también influye significativamente sobre las características de las nanopartículas sintetizadas. Estos compuestos, según su capacidad de adherirse o interactuar en la superficie metálica afectan la cinética de los

procesos de nucleación y crecimiento, repercutiendo sobre el tamaño, morfología e incluso sobre la fase cristalina de las nanopartículas generadas [9].

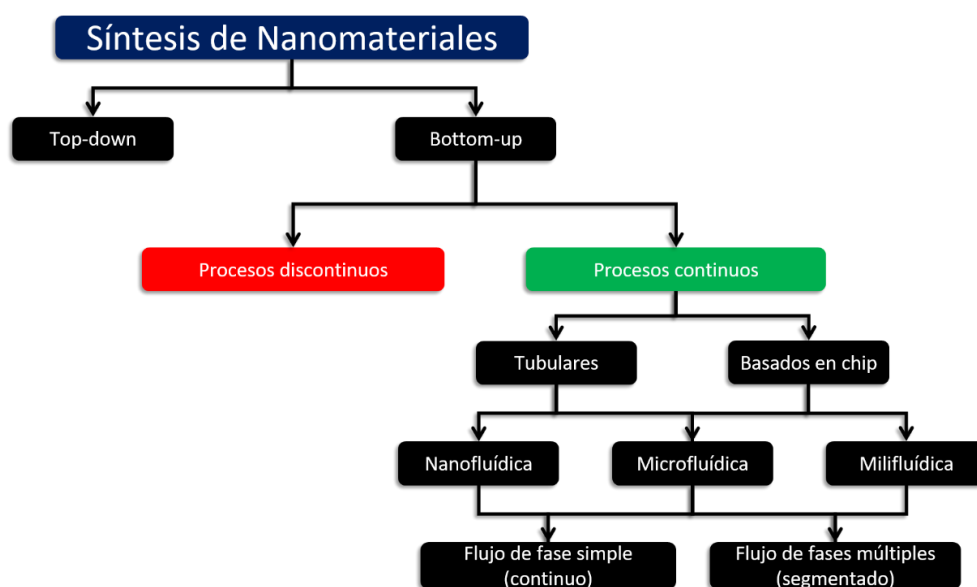
### 1.2.3. Síntesis en sistema continuo

Los métodos de síntesis bottom-up pueden ser procesos *discontinuos* o *continuos* (Figura 1.4). Los sistemas discontinuos son los más convencionales, pero presentan algunas desventajas tales como: i) distribución heterogénea de temperatura y reactivos dentro del reactor, ii) mezclas ineficientes y difíciles de controlar, iii) diferentes propiedades fisicoquímicas de los productos obtenidos en diferentes lotes con iguales condiciones, iv) procesos de purificación y lavado con gran consumo de solventes, v) rendimientos bajos, del orden de unos pocos miligramos. Para intentar superar estas desventajas, los sistemas continuos ofrecen una muy buena alternativa para la síntesis de nanopartículas, ya que con ellos es posible controlar más eficazmente la temperatura, los tiempos de residencia, la composición de la mezcla reaccionante, entre otros; lo que lleva a un mejor control del tamaño de partículas con distribuciones monomodales, como también al ahorro de reactivos y energía y optimización del tiempo de reacción. En un microrreactor la síntesis en flujo continuo tiene lugar en una interfase de dos corrientes en flujo laminar controlada por la difusión molecular, mientras que en un reactor discontinuo la mezcla se establece con un proceso conectivo rápido. Las pequeñas dimensiones de los canales del microrreactor conducen a una elevada relación área/volumen ( $10.000\text{--}50.000\text{ m}^2/\text{m}^3$  comparado con  $100\text{ m}^2/\text{m}^3$  para el reactor discontinuo) y a un incremento en las fuerzas impulsoras de transporte de calor y masa [10]. Estos sistemas microfluídicos ofrecen bajo costo, facilidad en el control de flujos y se evita que la polidispersidad de tamaños varíe entre un lote de síntesis y otro. El desarrollo de reactores con dimensiones del orden de sub-milímetros es muy flexible, admitiendo trazar diseños con diferentes geometrías que permiten optimizar el tamaño y la composición de la síntesis de nanopartículas, controlar modelos de flujo en forma precisa y lograr un óptimo contacto entre los reactivos. Por otra parte, para la síntesis de nanometariales con estos dispositivos, los procesos de mezclado de reactivos, nucleación y maduración suceden en el mismo sistema, mientras que con los reactores de macroescala muchas veces se requieren unidades acopladas externamente para cada etapa. La velocidad de nucleación y crecimiento de las partículas depende de la



concentración local de los reactivos. En particular, las condiciones locales de transporte de materia y de mezclado por interdifusión están estrechamente vinculadas con el caudal y la geometría del sistema y esto influye sobre mejores distribuciones de tamaño de partículas si se compara con el sistema batch. Los métodos discontinuo y continuo ya se han probado comparativamente para la síntesis de nanopartículas como: quantum dots, Au, TiO<sub>2</sub>, Co, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ag, BaSO<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>, Cu, zeolitas tipo NaA,  $\gamma$ -FeO(OH) (goethite), etc., como también materiales nanoparticulados tipo core/shell basados en Au/Ag, CdSe/ZnS, SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/SiO<sub>2</sub>, etc. En la literatura pueden encontrarse reportes con muy buen nivel científico sobre síntesis de nanopartículas [11-13].

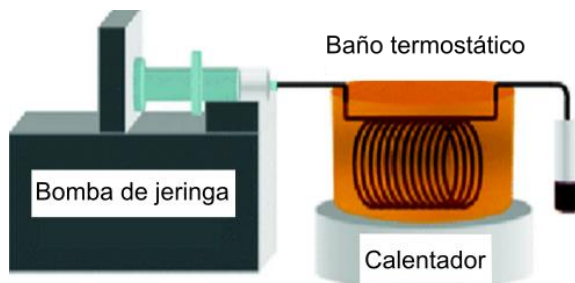
A su vez, los procesos continuos se dividen en dos grandes categorías: *tubulares* y *basados en chips* (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema de las diferentes metodologías utilizadas para la síntesis de nanomateriales.

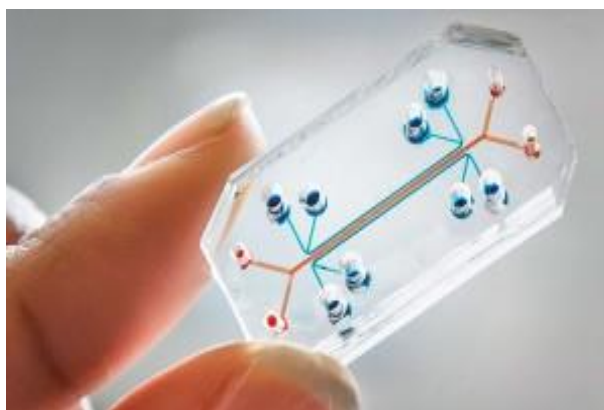
Los sistemas tubulares son por lo general reactores con una estructura simple y fáciles de fabricar (Figura 1.5). Estos sistemas emplean tuberías conectadas a través de uniones para el flujo de fluidos líquidos. Los diámetros internos de las conexiones y conductos varían desde escala micrométrica hasta milimétrica y pueden ser de vidrio, acero inoxidable o polímero (PEEK o PVC). En estos sistemas es posible controlar la

temperatura de reacción en un amplio rango a través de baños de agua o aceite termostáticos [14, 15].



**Figura 1.5. Síntesis en sistema continuo. Modelo de reactor continuo tubular.**

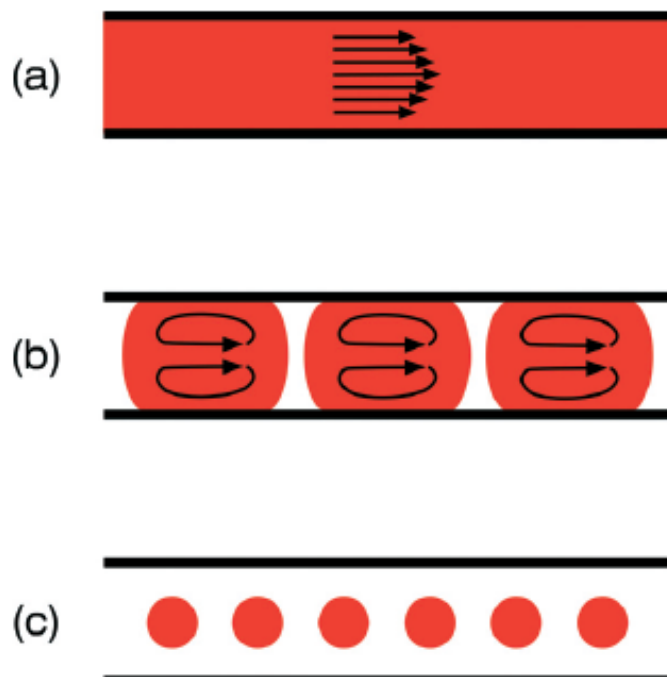
Los dispositivos basados en chips contienen microcanales cuyas dimensiones varían desde 1 a 10 cm de largo y de 10 a 100  $\mu\text{m}$  de espesor (Figura 1.6). Dependiendo de su aplicación y las condiciones de operación, pueden ser fabricados con polímeros, metales o siliconas, mediante litografía, grabado húmedo o técnicas micromecanizadas. Además, se diseñan en función de las necesidades individuales de cada reacción y pueden integrar diversos componentes como microbombas, microválvulas, micromezcladores, microcalentadores, sensores ópticos o electroquímicos. De esta forma se pueden integrar múltiples procesos químicos (por ejemplo calentamiento, enfriamiento, mezcla, adición de reactivos) en un mismo dispositivo de pequeñas dimensiones [14, 15].



**Figura 1.6. Síntesis en sistema continuo. Modelo de micromezclador continuo basado en chip.**

En un nivel diferente, los reactores pueden clasificarse de acuerdo a la fase fluida: *fase simple* (continua) o *fases múltiples* (segmentada o en gotas). Hasta la fecha, las investigaciones se han centrado en reactores de fase simple en la cual dos o más soluciones miscibles de reactivos se inyectan en las tuberías o canales donde se mezclan y reaccionan (Figura 1.7-a). Estos reactores monofásicos ofrecen un alto grado de flexibilidad, tolerando un amplio rango de velocidades de flujo y disolventes. Además, facilita las inyecciones adicionales de reactivos de manera controlada en diferentes puntos del canal de reacción, lo que hace sencillo desarrollar reacciones de pasos múltiples. Sin embargo presentan dos limitaciones: (i) el líquido que fluye a través del canal lo hace con un perfil de velocidad parabólico, de manera la que mayor velocidad se alcanza en el centro, lo que a su vez genera una distribución del tiempo de residencia no homogénea dentro del reactor dando lugar a una dispersión en las propiedades de las nanopartículas formadas y (ii) la deposición de precursores y/o productos sobre las paredes puede dar lugar a incrustaciones, que afectan al flujo y a la vida útil del reactor [15].

Los reactores de fases múltiples pueden dar respuesta a las limitaciones de los reactores de fase continua. La inyección adicional de un fluido inmiscible (líquido o gaseoso) en el canal divide la mezcla de reacción en una sucesión discreta de “segmentos” o “gotas” (Figura 1.7-b y c), que pasan a través del reactor a una misma velocidad, eliminando de esta forma el problema de la dispersión de velocidades. En el caso del flujo segmentado (Figura 1.7-b), la mezcla de reacción mantiene el contacto con la pared del canal, pero la abrasión de la segunda fase puede ayudar a reducir o incluso eliminar las incrustaciones, aumentando la vida media del reactor. En cambio, la formación de gotas (Figura 1.7-c) hace que la mezcla de reacción permanezca completamente separada de la pared a través del líquido inmiscible, impidiendo la deposición de reactivos y/o productos [15].



**Figura 1.7. Síntesis en sistema continuo.** Diagrama de los tipos de flujo en un reactor continuo [15].

En vista a las ventajas que presentan los sistemas continuos, en los últimos años se ha incrementado el interés en utilizar esta metodología para la síntesis de nanomateriales [16-19]. En este marco se han desarrollado diversos diseños de microrreactores, ya sea en tubulares o en chips, sistemas micro o milifluídicos y en fase continua o segmentada; y se ha intensificado el estudio fluidodinámico tanto teórico como práctico con el objetivo de mejorar los rendimientos.

En este marco, Patit y col. [20] plantearon la síntesis de nanopartículas de plata comparando un sistema discontinuo con uno continuo mediante el uso de microrreactor en forma de “Y” en fase continua. Emplearon  $\text{AgNO}_3$  como sal precursora,  $\text{NaBH}_4$  como reductor y propusieron dos posibles agentes protectores: dodecil sulfato de sodio (SDS) y CTAB. De esta manera, demostraron que empleando el microrreactor se obtienen partículas monodispersas (3-7 nm) en comparación del sistema discontinuo y que el tipo de protector influye en el tamaño de partículas obtenidas. Mientras que Xu y col. [21, 22] utilizaron microrreactores tipo chip en forma de “T” para la síntesis de nanopartículas de plata y cobre mediante flujo segmentado con la formación de microgotas. Utilizaron  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y aceite mineral como fase continua

para la formación de las microgotas. En ambos casos observaron que el aumento del caudal da lugar a un aumento en el tamaño de las partículas. Por otro lado, Biswas y col. [23] evaluaron la síntesis de partículas de cobre muy pequeñas con un sistema milifluídico de fase continua, reduciendo  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  con  $\text{NaBH}_4$  en presencia de mercapto polietilenglicol monometil éter (PEG-thiol). A diferencia del caso anterior, para este diseño observaron que el aumento del caudal produce una disminución en el tamaño de las partículas. En este sentido, Knauer y col. [24] sintetizaron nanoprismas de Ag en continuo con flujo segmentado en dos etapas. La primera basada en la obtención de semillas de plata con una mezcla a través de flujo segmentado de una solución de citrato de sodio y otra de  $\text{NaBH}_4$  y poli (sodio estirenosulfonato de sodio), y seguidamente con una solución de  $\text{AgNO}_3$ . La segunda etapa, a su vez, involucró un flujo segmentado mezclando la suspensión de semillas previamente formadas y ácido ascórbico con una solución de  $\text{AgNO}_3$ . Finalmente, el crecimiento de las semillas se completó mediante un proceso discontinuo. Con este trabajo queda reflejado que, a través de un buen diseño, se pueden realizar agregados secuenciales de diversos reactivos logrando partículas con formas y tamaños determinados de muy buena calidad.

#### 1.2.4. Síntesis “verde” de nanopartículas

Actualmente, los trabajos científicos tienden a enfocarse en el concepto de "química verde". Esta definición surge en 1996 como "diseño de productos químicos y procesos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas" [25]. Los procesos en las áreas de la química y la tecnología química amigables con el ambiente son cada vez más populares dada la necesidad de controlar los problemas relacionados con la contaminación del ecosistema. Por eso, en los últimos años, el desarrollo de productos químicos tiende a ajustarse a los principios de la química verde implementando reactivos menos peligrosos y procesos de síntesis que generen desechos inocuos y fáciles de eliminar o recuperar [26].

En la bibliografía se encuentran diferentes métodos de síntesis de nanopartículas, incluidos: químicos, térmicos, reducción sonoquímica, deposición de vapor al vacío, métodos de radiación, técnicas de microemulsión o ablación por láser [27, 28]. Dentro de los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas metálicas, la síntesis por reducción química se destaca por ser uno de los procesos de síntesis, tanto en medio

acuoso como orgánico, más conveniente y prometedor debido a su simplicidad, viabilidad, bajo costo y por la capacidad de poder controlar tamaño y forma de las partículas [29-31]. Además, la reducción química presenta la ventaja de poder controlar fácilmente el proceso de reacción y el grado de producción. Este proceso está basado en la reducción de un ion metálico en solución y tiene tres factores claves que influyen sobre las características de las nanopartículas: i) el disolvente, ii) el agente reductor, y iii) los agentes protectores y estabilizadores [32]. Sin embargo, las reacciones de reducción más frecuentes utilizan agentes químicos peligrosos, como  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{N}_2\text{H}_4$  entre los más comunes.

En consecuencia, se han evaluado diferentes moléculas biológicas como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas metálicas siguiendo procedimientos seguros, sostenibles y ecológicos. Se han informado microorganismos que actúan como biorreactores, tales como bacterias, hongos y virus, produciendo una variedad de nanopartículas intra o extracelularmente [33]. En este aspecto se ha comprobado que los microorganismos excretan diferentes productos reductores y pueden codificarse genéticamente para sobreexpresar reductores específicos con el fin de controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas [33]. Los extractos vegetales de tallos, flores, hojas y semillas también han sido extensamente estudiados ya que están constituidos por polifenoles, proteínas, alcaloides, ácidos fenólicos, azúcares, terpenoides, entre otros; que podrían actuar como agentes estabilizadores y reductores [34, 35]. A pesar de que el uso de protocolos de síntesis mediante microorganismos o extractos vegetales responde a los principios verdes principales, el primer caso implica el control estricto de pH y de temperatura, y el segundo no garantiza un ajuste suficiente sobre la composición química de la solución.

Los polisacáridos también se han propuesto como reductores químicos verdes en la síntesis de nanopartículas, esto permite el uso de agua como disolvente evitando la necesidad de disolventes tóxicos [36]. Los grupos hidroxilo presentes en las estructuras de polisacáridos son responsables de la alta solubilidad en agua y de la capacidad de reducir precursores metálicos. Además, los polisacáridos tienen la capacidad de actuar como agentes protectores. En la literatura se encuentra una gran cantidad de ejemplos donde la glucosa y el almidón se proponen como agentes reductores [37-39] y

protectores [39, 40], mientras que muchas publicaciones refieren a la combinación de ambos hidratos de carbono [41-44].

En general, el uso de productos naturales para la síntesis de nanomateriales es un área emergente y promisorio de la nanotecnología y puede tener un impacto directo y significativo en los nuevos avances de la biotecnología.

### 1.3. Nanopartículas para la remediación y control ambiental

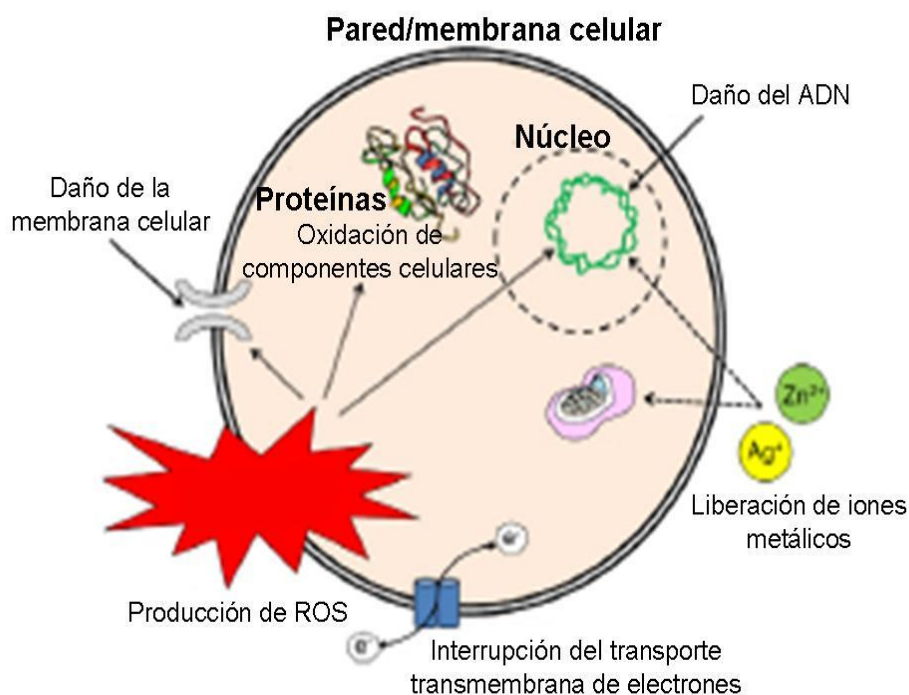
Debido a las propiedades únicas de los nanomateriales, por ejemplo la elevada relación superficie-volumen y una alta reactividad, los campos de aplicación son innumerables: industria farmacéutica, cosmética y electrónica, tecnologías relacionadas con la energía y el ambiente, catálisis, entre otras. Consecuentemente el interés sobre la nanotecnología ambiental ha crecido notablemente. Los nanomateriales se están explotando como novedosas herramientas para la detección de contaminantes ambientales, el control biológico de patógenos, el tratamiento de aguas residuales, entre otras [45].

Debido a la alta incidencia de infecciones bacterianas y a la creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos convencionales, surge la necesidad de nuevas formulaciones. Por este motivo es necesario estudiar y evaluar nuevos métodos para reducir la actividad bacteriana, y las infecciones asociadas. De esta manera, la nanotecnología surge como una alternativa cada vez más interesante para aplicaciones médicas y es de gran interés como método para eliminar o reducir la actividad de numerosos microorganismos patógenos [46].

#### 1.3.1. Nanopartículas con propiedades antimicrobianas

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas ofrecen buena respuesta frente a un amplio rango de microorganismos [47]. Incluso pueden superar los mecanismos de resistencia a fármacos existentes, como la disminución de la captación y aumento del flujo de salida de medicamentos de la célula microbiana, la formación de biopelículas y bacterias intracelulares [48]. Los mecanismos antimicrobianos de los nanomateriales incluyen: 1) la generación fotocatalítica de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), que dañan componentes celulares y virales, 2) daño sobre la

pared / membrana celular bacteriana, 3) interrupción del transporte transmembrana de electrones, y 4) inhibición de la actividad enzimática y síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico) (Figura 1.8) [49].



**Figura 1.8. Actividad antimicrobiana de los nanomateriales.** Esquema de los posibles mecanismos [49].

Las nanopartículas antibacterianas generalmente consisten en metales u óxidos metálicos, sustancias antibacterianas de origen natural (quitano, péptidos), nanomateriales basados en carbono y nanoemulsiones a base de tensoactivos [50]. La Tabla 1.1 resume algunos nanomateriales antimicrobianos, sus mecanismos y potencial aplicación en procesos clínicos e industriales [49].



**Tabla 1.1.** Nanomateriales antimicrobianos [49].

Nanomateriales	Mecanismo antimicrobiano	Aplicación clínica e industrial
AgNp	Liberación de iones $\text{Ag}^+$ , disrupción de membrana celular y transporte de electrones, daño al DNA.	Revestimiento para heridas quirúrgicas y pie diabético; revestimientos para el uso de dispositivos médicos, filtros de agua portátiles; agente antibacteriano, agente antifúngico.
ZnONp	Acumulación intracelular de nanopartículas, daño en la membrana celular, producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ , liberación de iones $\text{Zn}^{2+}$ .	Cremas antibacterianas, lociones y ungüentos; revestimiento de la superficie de dispositivos médicos; enjuague bucal.
$\text{TiO}_2\text{Np}$	Producción de ROS, daño de la membrana y la pared celular.	Agente antibacteriano, agente esterilizante de alimentos, purificadores de aire, sistemas de tratamiento de agua.
AuNp	Interacción con la membrana celular, atracción electrostática fuerte.	Terapia fototermal, agente antifúngico.
Quitosano	Aumento de la permeabilidad y ruptura de la membrana, quelación de trazas metálicas, inactivación enzimática.	Desinfectante de agua, inmovilizador de bacterias, microbiocida en productos biomédicos.
Nanoemulsiones	Disrupción de la membrana.	Inhalador antimicrobiano, agente anti-biofilm, aplicaciones nasales, agente de transporte en vacunas.
Nanotubos de carbono	Daño en la membrana por producción de ROS, oxidación de proteínas y lípidos de la membrana celular.	Agente antibacteriano, filtros de agua, recubrimiento de superficies.

Abreviaturas: AgNp, las nanopartículas de plata; ZnONp, las nanopartículas de óxido de zinc;  $\text{TiO}_2\text{Np}$ , las nanopartículas de óxido de titanio; AuNp, las nanopartículas de oro; ROS, especies reactivas de oxígeno.

## 1.4. Nanopartículas de plata y cobre

### 1.4.1. Síntesis de nanopartículas de plata y cobre

Trabajos reportados en los últimos diez años revelan el creciente esfuerzo por encontrar nuevas y ecológicas alternativas para la producción de nanopartículas de plata (AgNp) y cobre (CuNp) (Tabla 1.2).

La mayoría de los trabajos reportados en el marco de la síntesis verde de materiales hasta ahora han sido dedicados a la obtención de AgNp, dada la importancia en área de la desinfección de ambientes hospitalarios y de la industria alimenticia. Darroudi y col. [51] estudiaron el efecto del tiempo de residencia en la síntesis de AgNp empleando glucosa como agente reductor y gelatina como agente protector. Con este protocolo en régimen discontinuo lograron obtener nanopartículas metálicas de aproximadamente 5 nm de diámetro. Khan y col. [52] propusieron el ácido ascórbico para reducir  $\text{AgNO}_3$  y almidón como agente estabilizante. Por otro lado, se han evaluado extractos de diferentes plantas, como por ejemplo Raj y col. [53] obtuvieron una suspensión de AgNp de entre 2 y 20 nm por reducción de  $\text{AgNO}_3$  con extractos de *Acmella oleracea*. Mientras que Chowdhury y col. [54] se basaron en el carácter reductor del ácido oxálico presente en extractos de cacao para la reducción de Ag obteniendo nanopartículas de alrededor de 25 nm. También, Horikoshi y col. [55] evaluaron la síntesis de AgNp empleando glucosa y microrreactores, y reportaron distribuciones de tamaño de partículas mayores comparados con los materiales producidos por métodos discontinuos. Sin embargo, en este trabajo, la estabilidad de las suspensiones de AgNp resultantes no se validó para períodos de envejecimiento prolongados, es decir, más de 2-3 meses [41, 56, 57].

En el caso de las CuNp, en contraste con metales nobles como Ag, Au y Pt, son muy difíciles de obtener por simple reducción de sales de cobre en solución. Las CuNp tienden a ser inestables debido a fenómenos de agregación o precipitación y oxidación durante el proceso de preparación o de almacenamiento. Para sobrellevar estas desventajas se han empleado agentes protectores como el ácido ascórbico (AA) [27, 58] que posee acción antioxidante, y surfactantes, como dodecilsulfato de sodio (SDS) [59] y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [28]; y polielectrolitos como polietilenglicoles [28] y polivinilpirrolidona (PVP) [28] que actúan como sistemas dispersantes. Xiong y col.

[32] emplearon  $\text{CuCl}_2$  como sal precursora y AA con funciones de reductor y estabilizante, obteniendo partículas de alrededor de 2 nm. Viet y col. y Gurav y col. [60, 61] además del AA como agente reductor, utilizaron CTAB y PVP como agentes estabilizantes. Por otro lado, Saravanan y col. [62] lograron obtener, no sólo CuNp, sino también AgNp, valiéndose de extracto de hojas de *Mukia maderasapata* y evaluaron su actividad antimicrobiana.

A partir de la información resumida en la Tabla 1.2, se puede concluir que el número de propuestas de diferentes protocolos de síntesis de AgNp y CuNp es extenso. Sin embargo, hasta el momento, la mayor parte de estas investigaciones que se ajustan total o parcialmente a los conceptos de la química verde, se ha desarrollado en sistemas discontinuos, mientras que las realizadas con microrreactores involucran reactivos que resultan tóxicos y nocivos para el ambiente.

**Tabla 1.2. Síntesis de nanopartículas de plata y cobre.** Publicaciones realizadas en los últimos años de protocolos basados en sistemas discontinuos y continuos.

Metal	Metodología de síntesis	Agente reductor		Año	Referencias
		Química verde	Tóxicos y/o nocivos		
Ag	Discontinuo	Glucosa		2003	[41]
Ag	Discontinuo		NaH	2007	[63]
Ag	Discontinuo		$\text{NaBH}_4$	2008	[64]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2009	[42]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2009	[65]
Ag	Discontinuo		$\text{NaBH}_4$	2009	[66]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2010	[38]
Ag	Discontinuo	PVP		2010	[67]

(Tabla 1.2, continuación)

Metal	Metodologías de síntesis	Agente reductor		Año	Referencias
		Química verde	Tóxicos y/o nocivos		
Ag	Discontinuo	Ácido ascórbico		2011	[68]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2011	[56]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2011	[51]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2011	[69]
Ag	Discontinuo	Hidroquinona		2011	[70]
Ag	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2011	[71]
Ag	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2012	[72]
Ag	Discontinuo	Glucosa		2012	[57]
Ag	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2012	[73]
Ag	Discontinuo	Ácido ascórbico		2013	[52]
Ag	Discontinuo	Citrato		2015	[74]
Ag	Discontinuo	Extracto Planta		2015	[53]
Ag	Discontinuo	Extracto Planta		2016	[53]
Ag	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub> / N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2016	[75]
Ag	Discontinuo	Extracto Chocolate		2016	[54]
Ag	Discontinuo	Microorganismo		2016	[76]
Ag	Discontinuo	Tocoferol		2016	[77]
Ag	Discontinuo	Lactosa		2011	[78]

(Tabla 1.2, continuación)

Metal	Metodologías de síntesis	Agente reductor		Año	Referencias
		Química verde	Tóxicos y/o nocivos		
Cu	Discontinuo	Ácido ascórbico	NaBH <sub>4</sub>	2000	[79]
Cu	Discontinuo	Glucosa		2006	[80]
Cu	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2009	[81]
Cu	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2009	[82]
Cu	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2010	[83]
Cu	Discontinuo	Ácido ascórbico		2011	[32]
Cu	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2011	[84]
Cu	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2012	[85]
Cu	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2012	[86]
Cu	Discontinuo	Ácido ascórbico	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2013	[87]
Cu	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2013	[88]
Cu	Discontinuo	Ácido ascórbico		2014	[60]
Cu	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2015	[89]
Cu	Discontinuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2015	[90]
Cu	Discontinuo	Ácido ascórbico		2016	[61]
Cu/Ag	Discontinuo		NaBH <sub>4</sub>	2008	[91]
Cu/Ag	Discontinuo	Extracto hojas		2016	[62]
Cu	Discontinuo/Continuo		NaBH <sub>4</sub> / N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2016	[92]
Ag	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2012	[24]

(Tabla 1.2, continuación)

Metal	Metodologías de síntesis	Agente reductor		Año	Referencias
		Química verde	Tóxicos y/o nocivos		
Ag	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2012	[20]
Ag	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2016	[21]
Cu	Continuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2010	[93]
Cu	Continuo		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	2010	[94]
Cu	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2011	[95]
Cu	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2012	[23]
Cu	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2013	[96]
Cu	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2014	[22]
Cu	Continuo		NaBH <sub>4</sub>	2015	[97]

#### 1.4.2. Actividad bactericida de las nanopartículas de plata y cobre

La plata y el cobre han sido los metales más estudiados como materiales nanoparticulados bactericidas dadas sus propiedades antimicrobianas [37, 56, 61, 76, 86, 87, 89, 91, 98-104].

La actividad bactericida de las nanopartículas metálicas ha sido atribuida a la combinación de varios mecanismos como la producción de ROS, modificación genética, penetración y daño de la pared celular e interacciones con proteínas y ADN [105, 106]. Estos mecanismos podrían estar asociados a la presencia de iones metálicos libres ( $M^{n+}$ ). Este hecho se refuerza con los resultados reportados de Lalueza y col. [107] y Delgado y col. [103] que observaron que a medida que aumentaba el grado de liberación de iones de Ag y Cu, mayor resulta la eficacia antimicrobiana. Si bien los mecanismos exactos aún no se conocen, los iones libres podrían competir con iones de zinc u otros iones

metálicos propios de la célula por los sitios claves de unión en las proteínas, dando lugar a un cambio conformacional y la pérdida de la función proteica [108]. También podrían inactivar a las proteínas dañando grupos funcionales de enzimas citoplasmáticas necesarias en la síntesis de aminoácidos [109].

Una propiedad fundamental del cobre que contribuye significativamente a su efecto tóxico es su capacidad para aceptar y donar electrones individuales a medida que cambia su estado de oxidación entre  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . De esta manera, puede actuar como catalizador para la generación de ROS, tales como radicales hidroxilos y aniones superóxidos. Estas especies ROS tienen el potencial de causar daños oxidativos a componentes celulares vitales, tales como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (incluidos los de la membrana celular) [110-112].

Por otra parte, la plata además de poseer actividad bactericida, presenta citotoxicidad contra células humanas [66, 113], mientras que la toxicidad del cobre en humanos ocurre a elevadas concentraciones. En general, la exposición al Cu se considera segura, como se evidencia por el uso generalizado de dispositivos intrauterinos y al bajo riesgo documentado sobre reacciones adversas al contacto dérmico con este metal [114, 115]. La baja sensibilidad de los tejidos humanos hacia el cobre contrasta con la sensibilidad extrema de los microorganismos a sus efectos tóxicos.

Por lo tanto, actualmente son grandes los esfuerzos por sintetizar AgNp como reservorios de iones de plata para ser incluidos en pinturas, fibras textiles y materiales quirúrgicos [116, 117]. De esta forma, los iones  $\text{Ag}^+$  se liberan lentamente, generando superficies asépticas contra microorganismos resistentes a múltiples fármacos y mejorando la asistencia sanitaria en los hospitales y en la industria alimenticia. De hecho, este principio se extiende a muchas otras aplicaciones, como el tratamiento del agua, catéteres, prótesis, envasado de alimentos, entre otras [118].

Por otro lado, se han desarrollado distintos métodos de síntesis de CuNp con la motivación de que son una alternativa frente a las AgNp, debido a sus efectos secundarios no deseados en seres humanos [66]. Sin embargo, desde el punto de vista de la síntesis, lograr CuNp metálicas estables sigue suponiendo un enorme desafío, dada la gran tendencia que presenta el cobre a oxidarse en condiciones ambientales [119].

No obstante, el empleo de las CuNp podría garantizar la presencia de un reservorio de  $\text{Cu}^{2+}$  para lograr una liberación controlada de iones por su oxidación natural que generaría una respuesta antimicrobiana sostenida en el tiempo.



## 1.5. Objetivos

Este trabajo se fundamenta en la necesidad de optimizar nuevos métodos de síntesis de nanopartículas que conduzcan a altas producciones de material en menor tiempo, con menor costo y buena calidad de productos en cuanto a las características fisicoquímicas y estructurales. Se propone, entonces, el método continuo mediante microrreactores. Las síntesis que se plantean tendrán aplicación en diversas áreas como la biomedicina, catálisis, adsorbentes, electrónica, entre otras; aunque serán enfocadas a la obtención de materiales con aplicación bactericida. El plan de Tesis se desarrolla mediante la experimentación en microrreactores continuos de diferentes geometrías y se comparan con el método discontinuo convencional tomando como referencia los protocolos reportados en bibliografía, priorizando la química “verde”, y ajustando los parámetros involucrados en los procesos con el fin de optimizar los rendimientos y las características fisicoquímicas del material sintetizado.

Se planea demostrar esta hipótesis planteando el siguiente **objetivo general**:

**Sintetizar materiales nanométricos con interés tecnológico mediante protocolos verdes en sistemas de reacción continua**, haciendo hincapié en el estudio de los fenómenos fisicoquímicos y fluidodinámicos (nucleación, crecimiento, reactivos de mezcla, geometría de los dispositivos continuos, entre otros), en el análisis de las variables específicas para la síntesis del material (tiempo de residencia, de contacto y envejecimiento, temperatura, pH, solventes, reductores, estabilizantes, entre otros) y en la evaluación del comportamiento de estas nanopartículas sobre las potenciales aplicaciones (bactericidas).

### 1.5.1. Objetivos específicos

- Síntesis de nanopartículas de plata y cobre mediante síntesis continua, evaluando diferentes reductores que resulten amigables con el medio ambiente.
- Caracterización fisicoquímica de los materiales sintetizados.
- Evaluación de la actividad bactericida de las nanopartículas.

## 1.6. Bibliografía

1. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom*. Engineering and Science, **1960**. 23 (5): p. 22.
2. Sanchez, F., Sobolev, K., *Nanotechnology in concrete - A review*. Construction and Building Materials, **2010**. 24: p. 2060.
3. *The National Nanotechnology Initiative - Strategic Plan*. Committee on Technology of the National Science and Technology Council, **2016**.
4. *The National Nanotechnology Initiative Supplement to the President's 2019 Budget*. Committee on Technology of the National Science and Technology Council, **2018**.
5. *Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties*. The Royal Society and The Royal Academy of Engineering, **2004**.
6. Salaheldeen Elnashaie, S., Danafar, F., Hashemipour Rafsanjani, H., *From nanotechnology to nanoengineering*. Nanotechnology for Chemical Engineers. **2015**, Springer, Singapore.
7. Spedalieri, A.C., *Formación de nanopartículas metálicas mediada por microalgas en suspensión y encapsuladas en hidrogeles*. Tesis Doctoral. **2015**. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
8. LaMer, V.K., Dinegar, R.H., *Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols*. Journal of the American Chemical Society, **1950**. 72 (11): p. 4847.
9. Miguel García, I., *Nanopartículas de Pd para su aplicación en catálisis y en sistemas de detección de H<sub>2</sub>*. Tesis Doctoral. **2013**. Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alicante.
10. Chang, C.-H., Paul, B.K., Remcho, V.T., Atre, S., Hutchison, J.E., *Synthesis and post-processing of nanomaterials using microreaction technology*. Journal of Nanoparticle Research, **2008**. 10 (6): p. 965.
11. Song, Y., Holmes, J., Kumar, C.S., *Microfluidic synthesis of nanomaterials*. Small, **2008**. 4 (6): p. 698.
12. Darr, J.A., Zhang, J., Makwana, N.M., Weng, X., *Continuous hydrothermal synthesis of inorganic nanoparticles: Applications and future directions*. Chemical Reviews, **2017**. 117 (17): p. 11125.
13. Plutschack, M.B., Pieber, B., Gilmore, K., Seeberger, P.H., *The hitchhiker's guide to flow chemistry*. Chemical Reviews, **2017**. 117 (18): p. 11796.

14. Krishna, K.S., Li, Y., Li, S., Kumar, C.S., *Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, **2013**. 65 (11-12): p. 1470.
15. Phillips, T.W., Lignos, I.G., Maceiczky, R.M., deMello, A.J., deMello, J.C., *Nanocrystal synthesis in microfluidic reactors: where next? Lab on a Chip*, **2014**. 14 (17): p. 3172.
16. Krishna, K.S., Biswas, S., Navin, C.V., Yamane, D.G., Miller, J.T., Kumar, C.S., *Millifluidics for chemical synthesis and time-resolved mechanistic studies*. Journal of Visualized Experiments, **2013** (81).
17. Boken, J., Kumar, D., Dalela, S., *Synthesis of nanoparticles for plasmonics applications: A microfluidic approach*. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, **2014**. 45 (8): p. 1211.
18. Watts, P., *Continuous flow reactor technology for nanomaterial synthesis*. Journal of Biochips & Tissue Chips, **2015**. 05 (01).
19. Zhang, J., Gong, C., Zeng, X., Xie, J., *Continuous flow chemistry: New strategies for preparative inorganic chemistry*. Coordination Chemistry Reviews, **2016**. 324: p. 39.
20. Patil, G.A., Bari, M.L., Bhanvase, B.A., Ganvir, V., Mishra, S., Sonawane, S.H., *Continuous synthesis of functional silver nanoparticles using microreactor: Effect of surfactant and process parameters*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, **2012**. 62: p. 69.
21. Xu, L., Peng, J., Yan, M., Zhang, D., Shen, A.Q., *Droplet synthesis of silver nanoparticles by a microfluidic device*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, **2016**. 102: p. 186.
22. Xu, L., Peng, J., Srinivasakannan, C., Zhang, L., Zhang, D., Liu, C., Wang, S., Shen, A.Q., *Synthesis of copper nanoparticles by a T-shaped microfluidic device*. RSC Advances, **2014**. 4 (48): p. 25155.
23. Biswas, S., Miller, J.T., Li, Y., Nandakumar, K., Kumar, C.S., *Developing a millifluidic platform for the synthesis of ultrasmall nanoclusters: ultrasmall copper nanoclusters as a case study*. Small, **2012**. 8 (5): p. 687.
24. Knauer, A., Csáki, A., Möller, F., Hühn, C., Fritzsche, W., Köhler, J.M., *Microsegmented flow-through synthesis of silver nanoprisms with exact tunable optical properties*. Journal of Physical Chemistry C, **2012**. 116 (16): p. 9251.
25. Anastas, P.T., Williamson, T.C., *Green chemistry: An overview*. Green Chemistry, Editor ACS. **1996**, American Chemical Society: Washington, DC. p. 1.
26. Anastas, P., Eghbali, N., *Green chemistry: Principles and practice*. Chemical Society Reviews, **2010**. 39 (1): p. 301.

27. Yu, W., Xie, H., Chen, L., Li, Y., Zhang, C., *Synthesis and characterization of monodispersed copper colloids in polar solvents*. Nanoscale Research Letters, **2009**. 4 (5): p. 465.
28. Park, B.K., Jeong, S., Kim, D., Moon, J., Lim, S., Kim, J.S., *Synthesis and size control of monodisperse copper nanoparticles by polyol method*. Journal of Colloid and Interface Science, **2007**. 311 (2): p. 417.
29. Yang, M., Zhu, J.-J., *Spherical hollow assembly composed of Cu<sub>2</sub>O nanoparticles*. Journal of Crystal Growth, **2003**. 256 (1): p. 134.
30. Zhang, H.-X., Siegert, U., Liu, R., Cai, W.-B., *Facile fabrication of ultrafine copper nanoparticles in organic solvent*. Nanoscale Research Letters, **2009**. 4 (7): p. 705.
31. Tokarek, K., Hueso, J.L., Kuśtrowski, P., Stochel, G., Kyzioł, A., *Green synthesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles*. European Journal of Inorganic Chemistry, **2013**. 2013 (28): p. 4940.
32. Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., Wu, X., *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid*. Green Chemistry, **2011**. 13 (4): p. 900.
33. Narayanan, K.B., Sakthivel, N., *Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes*. Advances in Colloid and Interface Science, **2010**. 156 (1-2): p. 1.
34. Shamaila, S., Sajjad, A.K.L., Ryma, N.-u.-A., Farooqi, S.A., Jabeen, N., Majeed, S., Farooq, I., *Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes*. Applied Materials Today, **2016**. 5: p. 150.
35. Kharissova, O.V., Dias, H.V., Kharisov, B.I., Perez, B.O., Perez, V.M., *The greener synthesis of nanoparticles*. Trends in Biotechnology, **2013**. 31 (4): p. 240.
36. Duan, H., Wang, D., Li, Y., *Green chemistry for nanoparticle synthesis*. Chemical Society Reviews, **2015**. 44 (16): p. 5778.
37. Kemp, M.M., Kumar, A., Clement, D., Ajayan, P., Mousa, S., Linhardt, R.J., *Hyaluronan- and heparin-reduced silver nanoparticles with antimicrobial properties*. Nanomedicine, **2009**. 4 (4): p. 421.
38. Filippio, E., Manno, D., Buccolieri, A., Di Giulio, M., Serra, A., *Shape-dependent plasmon resonances of Ag nanostructures*. Superlattices and Microstructures, **2010**. 47 (1): p. 66.
39. El-Rafie, M.H., Ahmed, H.B., Zahran, M.K., *Facile precursor for synthesis of silver nanoparticles using alkali treated maize starch*. International Scholarly Research Notices, **2014**. 2014: p. 12.
40. Vigneshwaran, N., Nachane, R.P., Balasubramanya, R.H., Varadarajan, P.V., *A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch*. Carbohydrate Research, **2006**. 341 (12): p. 2012.

41. Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S.L., *Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125 (46): p. 13940.
42. Singh, M., Sinha, I., Mandal, R.K., *Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles*. Materials Letters, **2009**. 63 (3-4): p. 425.
43. Chairam, S., Poolperm, C., Somsook, E., *Starch vermicelli template-assisted synthesis of size/shape-controlled nanoparticles*. Carbohydrate Polymers, **2009**. 75 (4): p. 694.
44. Cheviron, P., Gouanvé, F., Espuche, E., *Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites*. Carbohydrate Polymers, **2014**. 108 (Supplement C): p. 291.
45. Ghasemzadeh, G., Momenpour, M., Omid, F., Hosseini, M.R., Ahani, M., Barzegari, A., *Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation*. Frontiers of Environmental Science & Engineering, **2014**. 8 (4): p. 471.
46. Seil, J.T., Webster, T.J., *Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature*. International Journal of Nanomedicine, **2012**. 7: p. 2767.
47. Weir, E., Lawlor, A., Whelan, A., Regan, F., *The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization*. Analyst, **2008**. 133 (7): p. 835.
48. Pelgrift, R.Y., Friedman, A.J., *Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance*. Advanced Drug Delivery Reviews, **2013**. 65 (13–14): p. 1803.
49. Huh, A.J., Kwon, Y.J., *“Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era*. Journal of Controlled Release, **2011**. 156 (2): p. 128.
50. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., Alvarez, P.J.J., *Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications*. Water Research, **2008**. 42 (18): p. 4591.
51. Darroudi, M., Ahmad, M.B., Zamiri, R., Zak, A.K., Abdullah, A.H., Ibrahim, N.A., *Time-dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, **2011**. 6: p. 677.
52. Khan, Z., Singh, T., Hussain, J.I., Obaid, A.Y., Al-Thabaiti, S.A., El-Mossalamy, E.H., *Starch-directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2013**. 102: p. 578.
53. Rithesh Raj, D., Prasanth, S., Vineeskumar, T.V., Sudarsanakumar, C., *Surface plasmon resonance based fiber optic dopamine sensor using green synthesized silver nanoparticles*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2016**. 224: p. 600.

54. Chowdhury, N.R., MacGregor-Ramiasa, M., Zilm, P., Majewski, P., Vasilev, K., *'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity*. Journal of Colloid and Interface Science, **2016**. 482: p. 151.
55. Horikoshi, S., Sumi, T., Serpone, N., *A hybrid microreactor/microwave high-pressure flow system of a novel concept design and its application to the synthesis of silver nanoparticles*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, **2013**. 73: p. 59.
56. Božanić, D.K., Dimitrijević-Branković, S., Bibić, N., Luyt, A.S., Djoković, V., *Silver nanoparticles encapsulated in glycogen biopolymer: Morphology, optical and antimicrobial properties*. Carbohydrate Polymers, **2011**. 83 (2): p. 883.
57. Ghaseminezhad, S.M., Hamed, S., Shojaosadati, S.A., *Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: comparative study of their properties*. Carbohydrate Polymers, **2012**. 89 (2): p. 467.
58. Chowdhury, M.N.K., Beg, M.D.H., Khan, M.R., Mina, M.F., *Synthesis of copper nanoparticles and their antimicrobial performances in natural fibres*. Materials Letters, **2013**. 98: p. 26.
59. Lisiecki, I., Billoudet, F., Pileni, M.P., *Control of the Shape and the Size of Copper Metallic Particles*. The Journal of Physical Chemistry, **1996**. 100 (10): p. 4160.
60. Gurav, P., Naik, S.S., Ansari, K., Srinath, S., Kishore, K.A., Setty, Y.P., Sonawane, S., *Stable colloidal copper nanoparticles for a nanofluid: Production and application*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2014**. 441: p. 589.
61. Viet, P.V., Nguyen, H.T., Cao, T.M., Hieu, L.V., *Fusarium antifungal activities of copper nanoparticles synthesized by a chemical reduction method*. Journal of Nanomaterials, **2016**. 2016: p. 1.
62. Saravanan, A., Kumar, P.S., Karthiga Devi, G., Arumugam, T., *Synthesis and characterization of metallic nanoparticles impregnated onto activated carbon using leaf extract of Mukia maderasapatna: Evaluation of antimicrobial activities*. Microbial Pathogenesis, **2016**. 97: p. 198.
63. Balan, L., Malval, J.-P., Schneider, R., Burget, D., *Silver nanoparticles: New synthesis, characterization and photophysical properties*. Materials Chemistry and Physics, **2007**. 104 (2-3): p. 417.
64. Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L., Jr., Surampalli, R.Y., Hu, Z., *The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth*. Water Research, **2008**. 42 (12): p. 3066.
65. Sharma, V.K., Yngard, R.A., Lin, Y., *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. Advances in Colloid and Interface Science, **2009**. 145 (1-2): p. 83.

66. AshaRani, P.V., Low Kah Mun, G., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells*. ACS Nano, **2009**. 3 (2): p. 279.
67. Chen, L., Zheng, L., Lv, Y., Liu, H., Wang, G., Ren, N., Liu, D., Wang, J., Boughton, R.I., *Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications*. Surface and Coatings Technology, **2010**. 204 (23): p. 3871.
68. Chamakura, K., Perez-Ballesteros, R., Luo, Z., Bashir, S., Liu, J., *Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2011**. 84 (1): p. 88.
69. Shervani, Z., Yamamoto, Y., *Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: Effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites*. Carbohydrate Research, **2011**. 346 (5): p. 651.
70. Bao, Q., Zhang, D., Qi, P., *Synthesis and characterization of silver nanoparticle and graphene oxide nanosheet composites as a bactericidal agent for water disinfection*. Journal of Colloid and Interface Science, **2011**. 360 (2): p. 463.
71. Lee, H.J., Lee, S.G., Oh, E.J., Chung, H.Y., Han, S.I., Kim, E.J., Seo, S.Y., Ghim, H.D., Yeum, J.H., Choi, J.H., *Antimicrobial polyethyleneimine-silver nanoparticles in a stable colloidal dispersion*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2011**. 88 (1): p. 505.
72. Sadeghi, B., Garmaroudi, F.S., Hashemi, M., Nezhad, H.R., Nasrollahi, A., Ardalan, S., Ardalan, S., *Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates*. Advanced Powder Technology, **2012**. 23 (1): p. 22.
73. Guzman, M., Dille, J., Godet, S., *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*. Nanomedicine, **2012**. 8 (1): p. 37.
74. Pandian, A.M., Karthikeyan, C., Rajasimman, M., Dinesh, M.G., *Synthesis of silver nanoparticle and its application*. Ecotoxicology and Environmental Safety, **2015**. 121: p. 211.
75. Zhao, X., Chen, B., Li, C., Wang, T., Zhang, J., Jiao, X., Chen, D., *Large-scale synthesis of size-controllable silver nanoplates and their application in detecting strong oxidants in aqueous solutions*. Chemical Engineering Journal, **2016**. 285: p. 690.
76. Buszewski, B., Rafińska, K., Pomastowski, P., Walczak, J., Rogowska, A., *Novel aspects of silver nanoparticles functionalization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2016**. 506: p. 170.
77. Shankar, S., Rhim, J.-W., *Tocopherol-mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial PBAT/silver nanoparticles composite films*. LWT - Food Science and Technology, **2016**. 72: p. 149.

78. Zhang, X., Niu, H., Yan, J., Cai, Y., *Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2011**. 375 (1-3): p. 186.
79. Janafi, N.R., Wangl, Z.L., Sau, T.K., *Seed-mediated growth method to prepare cubic copper nanoparticles*. Current Science, **2000**. 79 (9).
80. Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S.K., Nath, S., Praharaj, S., Basu, S., Pal, T., *Selective one-pot synthesis of copper nanorods under surfactantless condition*. Polyhedron, **2006**. 25 (5): p. 1263.
81. Pucek, R., Kvítek, L., Panáček, A., Vančurová, L., Soukupová, J., Jančík, D., Zbořil, R., *Polyacrylate-assisted synthesis of stable copper nanoparticles and copper(I) oxide nanocubes with high catalytic efficiency*. Journal of Materials Chemistry, **2009**. 19 (44): p. 8463.
82. Vazquez-Vazquez, C., Banobre-Lopez, M., Mitra, A., Lopez-Quintela, M.A., Rivas, J., *Synthesis of small atomic copper clusters in microemulsions*. Langmuir, **2009**. 25 (14): p. 8208.
83. Singh, M., Sinha, I., Premkumar, M., Singh, A.K., Mandal, R.K., *Structural and surface plasmon behavior of Cu nanoparticles using different stabilizers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**. 359 (1-3): p. 88.
84. Luo, H., Zhao, Y., Sun, L., *Synthesis and characterization of micrometer Cu/PVP architectures*. Materials Research Bulletin, **2011**. 46 (8): p. 1151.
85. Liu, Q.-m., Zhou, D.-b., Yamamoto, Y., Ichino, R., Okido, M., *Preparation of Cu nanoparticles with NaBH<sub>4</sub> by aqueous reduction method*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, **2012**. 22 (1): p. 117.
86. Chatterjee, A.K., Sarkar, R.K., Chattopadhyay, A.P., Aich, P., Chakraborty, R., Basu, T., *A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against E. Coli*. Nanotechnology, **2012**. 23 (8): p. 085103.
87. Usman, M.S., El Zowalaty, M.E., Shameli, K., Zainuddin, N., Salama, M., Ibrahim, N.A., *Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, **2013**. 8: p. 4467.
88. Pinto, R.J., Daina, S., Sadocco, P., Pascoal Neto, C., Trindade, T., *Antibacterial activity of nanocomposites of copper and cellulose*. Biomed Research International, **2013**. 2013: p. 280512.
89. Kruk, T., Szczepanowicz, K., Stefanska, J., Socha, R.P., Warszynski, P., *Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2015**. 128: p. 17.



90. Ong, H.R., Rahman Khan, M.M., Ramli, R., Du, Y., Xi, S., Yunus, R.M., *Facile synthesis of copper nanoparticles in glycerol at room temperature: formation mechanism*. RSC Advances, **2015**. 5 (31): p. 24544.
91. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S., *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. Acta Biomaterialia, **2008**. 4 (3): p. 707.
92. Chatterjee, S., Maji, N.C., Shaik, A.H., Chakraborty, J., *Economical and high throughput synthesis of copper nanopowder using continuous stirred tank and tubular flow reactors*. Chemical Engineering Journal, **2016**. 304: p. 241.
93. Wei, X., Wang, L., *Synthesis and thermal conductivity of microfluidic copper nanofluids*. Particuology, **2010**. 8 (3): p. 262.
94. Zhang, Y., Jiang, W., Wang, L., *Microfluidic synthesis of copper nanofluids*. Microfluidics and Nanofluidics, **2010**. 9 (4-5): p. 727.
95. Ke, T., Zeng, X.-F., Wang, J.-X., Le, Y., Chu, G.-W., Chen, J.-F., Shao, L., *Microfluidic synthesis of monodisperse Cu nanoparticles in aqueous solution*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, **2011**. 11 (6): p. 5154.
96. Li, Y., Yamane, D.G., Li, S., Biswas, S., Reddy, R.K., Goettert, J.S., Nandakumar, K., Kumar, C.S.S.R., *Geometric optimization of liquid-liquid slug flow in a flow-focusing millifluidic device for synthesis of nanomaterials*. Chemical Engineering Journal, **2013**. 217: p. 447.
97. Xu, L., Peng, J., Srinivasakannan, C., Chen, G., Shen, A.Q., *Synthesis of copper nanocolloids using a continuous flow based microreactor*. Applied Surface Science, **2015**. 355: p. 1.
98. Kazachenko, A.S., Legler, A.V., Per'yanova, O.V., Vstavskaya, Y.A., *Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with histidine and tryptophan*. Pharmaceutical Chemistry Journal, **2000**. 34 (5): p. 257.
99. Tankhiwale, R., Bajpai, S.K., *Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2009**. 69 (2): p. 164.
100. Valodkar, M., Modi, S., Pal, A., Thakore, S., *Synthesis and anti-bacterial activity of Cu, Ag and Cu-Ag alloy nanoparticles: A green approach*. Materials Research Bulletin, **2011**. 46 (3): p. 384.
101. Angelova, T., Rangelova, N., Yuryev, R., Georgieva, N., Müller, R., *Antibacterial activity of SiO<sub>2</sub>/hydroxypropyl cellulose hybrid materials containing silver nanoparticles*. Materials Science and Engineering: C, **2012**. 32 (5): p. 1241.

102. Ren, G., Hu, D., Cheng, E.W., Vargas-Reus, M.A., Allaker, R.P., *Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*. International journal of antimicrobial agents, **2009**. 33 (6): p. 587.
103. Delgado, K., Quijada, R., Palma, R., Palza, H., *Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent*. Letters in Applied Microbiology, **2011**. 53 (1): p. 50.
104. Dankovich, T.A., Levine, J.S., Potgieter, N., Dillingham, R., Smith, J.A., *Inactivation of bacteria from contaminated streams in Limpopo, South Africa by silver- or copper-nanoparticle paper filters*. Environmental Science: Water Research & Technology, **2016**. 1: p. 85.
105. Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H., *Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity*. Journal of Nanobiotechnology, **2017**. 15 (1): p. 65.
106. Wang, L., Hu, C., Shao, L., *The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future*. International Journal of Nanomedicine, **2017**. 12: p. 1227.
107. Lalueza, P., Monzón, M., Arruebo, M., Santamaría, J., *Bactericidal effects of different silver-containing materials*. Materials Research Bulletin, **2011**. 46 (11): p. 2070.
108. Borkow, G., Gabbay, J., *Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections*. Current Chemical Biology, **2009**. 3 (3): p. 272.
109. Macomber, L., Imlay, J.A., *The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2009**. 106 (20): p. 8344.
110. Warnes, S.L., Green, S.M., Michels, H.T., Keevil, C.W., *Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs*. Applied and Environmental Microbiology, **2010**. 76 (16): p. 5390.
111. Warnes, S.L., Caves, V., Keevil, C.W., *Mechanism of copper surface toxicity in Escherichia coli O157:H7 and Salmonella involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria*. Environmental Microbiology, **2012**. 14 (7): p. 1730.
112. Espírito Santo, C., Lam, E.W., Elowsky, C.G., Quaranta, D., Domaille, D.W., Chang, C.J., Grass, G., *Bacterial killing by dry metallic copper surfaces*. Applied and Environmental Microbiology, **2011**. 77 (3): p. 794.
113. Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., *Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour*. Toxicology and Applied Pharmacology, **2012**. 258 (2): p. 151.
114. Hostynek, J.J., Maibach, H.I., *Copper hypersensitivity: Dermatologic aspects*. Dermatologic Therapy, **2004**. 17 (4): p. 328.

115. Sivin, I., *Utility and drawbacks of continuous use of a copper T IUD for 20 years*. Contraception, **2007**. 75 (6): p. S70.
116. Kumar, A., Vemula, P.K., Ajayan, P.M., John, G., *Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil*. Nature Materials, **2008**. 7: p. 236.
117. Ilana, P., Guy, A., Nina, P., Geoffrey, G., Serguei, M., Aharon, G., *Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity*. Nanotechnology, **2008**. 19 (24): p. 245705.
118. Quang Huy, T., Van Quy, N., Anh-Tuan, L., *Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2013**. 4 (3): p. 033001.
119. Kanninen, P., Johans, C., Merta, J., Kontturi, K., *Influence of ligand structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles*. Journal of Colloid and Interface Science, **2008**. 318 (1): p. 88.



## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



**2.**EXPERIMENTAL



## Capítulo 2 : Experimental

---

### 2.1. Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas metálicas mediante reducción química es el método más aplicado por su simplicidad, viabilidad, bajo costo y por la amplia capacidad de controlar tamaño y forma de las partículas. El proceso se basa en la reducción química de un ion metálico y es necesario tener en cuenta varios factores, tales como el disolvente y tipo y concentración del agente reductor, del precursor metálico, de los estabilizantes; así como también la temperatura, el pH, el tiempo de síntesis o residencia y la relación de los reactivos.

En este trabajo se presenta la síntesis de nanopartículas de Ag (AgNp) y de cobre (CuNp). En primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionaron determinados protocolos que se tomaron como fuente de partida. Luego, según cada caso, se modificaron las condiciones de reacción para adaptar la síntesis de régimen discontinuo a régimen continuo. Las nanopartículas se caracterizaron mediante espectroscopia de absorción UV-visible para determinar la resonancia del plasmón de superficie y mediante dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) para evaluar el diámetro y distribución de tamaño de partícula.

Las síntesis de AgNp y CuNp se presentarán en capítulos separados. En cada caso se estudiaron las condiciones de reacción en el sistema discontinuo y luego se aplicaron en el continuo. A su vez, en otro capítulo se presenta la optimización mediante diseño experimental de la síntesis de CuNp a partir de uno de los protocolos seleccionados.

Por último, se trata la actividad bactericida de las AgNp y CuNp empleando *Escherichia coli* como bacteria modelo.

#### 2.1.1. Síntesis en sistemas discontinuos

Las síntesis en sistemas discontinuos se realizaron en recipientes cerrados con sistema de reflujo, bajo agitación magnética y en baño con control de temperatura.

- Síntesis de AgNp

La síntesis de AgNp se basó en el trabajo publicado por Raveendran y col. [1], empleando  $\text{AgNO}_3$  como precursor, glucosa como reductor y almidón como agente protector. Partiendo de este trabajo se planteó estudiar la relación Ag/glucosa y la influencia de la temperatura sobre el tamaño y estabilidad de las partículas.

### - Síntesis de CuNp

En la bibliografía se han reportado numerosos protocolos dentro de los cuales, en este trabajo, se evaluaron sólo cuatro (Tabla 2.1). Cada uno se tomó como referencia para realizar luego las modificaciones necesarias para lograr el objetivo. Estas modificaciones serán tratadas individualmente en el capítulo 4.

**Tabla 2.1.** Protocolos de referencia empleados para la síntesis de CuNp.

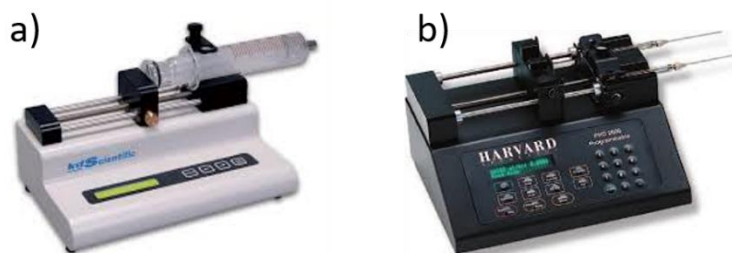
Autores	Reductor	Precursor	Protector
Tang y col. [2]	$\text{NaH}_2\text{PO}_2$	$\text{CuSO}_4$	PVP-CTAB
Xiong y col. [3]	Dopamina	$\text{CuCl}_2$	Dopamina
Singh y col. [4]	$\text{N}_2\text{H}_4$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	PVP
Xiong y col. [5]	Ácido ascórbico	$\text{CuCl}_2$	Ácido ascórbico

### 2.1.2. Síntesis en sistemas continuos

La síntesis continua se realizó con el conjunto de parámetros optimizados con el sistema discontinuo. Luego se realizó la comparación sistemática entre los materiales obtenidos con cada sistema de reacción.

La alimentación de los dispositivos con las corrientes reaccionantes se realizó mediante dos modelos de bombas de jeringas, Kd Scientific (modelo KDS100) y/o Harvard (modelo PHD 2000 Infusion), que se detallan en la Figura 2.1.



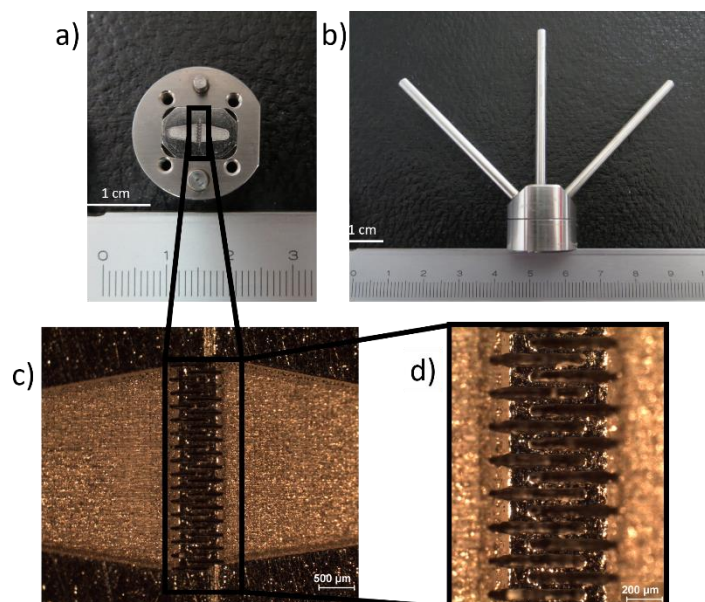


**Figura 2.1. Bombas de jeringas empleadas para la alimentación de los microrreactores.** a) Bomba de jeringa Kd Scientific (modelo KDS100). b) Bomba de doble jeringa Harvard (modelo PHD 2000 Infusion).

Se evaluaron diferentes sistemas con distintos tipos de micromezcladores y tuberías. A continuación se detallan las características de cada uno.

- Micromezclador interdigital de acero inoxidable:

Microrreactor de acero inoxidable interdigital desarrollado por el Instituto de Microelectrónica de Mainz (Alemania) (Figura 2.1-b, c y d). A la salida se utilizó una tubería Tygon® transparente con diámetro interno de 1,3 mm (Figura 2.2-a)



**Figura 2.2. Micromezclador interdigital de inoxidable.** a) y b) Fotografías digitales. c) y d) Imágenes de microscopio óptico de los microcanales interdigitales.

- Micromezcladores de teflón con unión tipo “Y” y “T”:

Los micromezcladores y las tuberías de teflón fueron adquiridos de IDEX Health & Science®: volumen de interno de 1,7  $\mu\text{l}$  (Y) y 2,9  $\mu\text{l}$  (T), con diámetro interno de 0,5 mm (Figura 2.3). Se conectaron con tuberías de diámetro externo de 1,6 mm e interno de 1 mm.

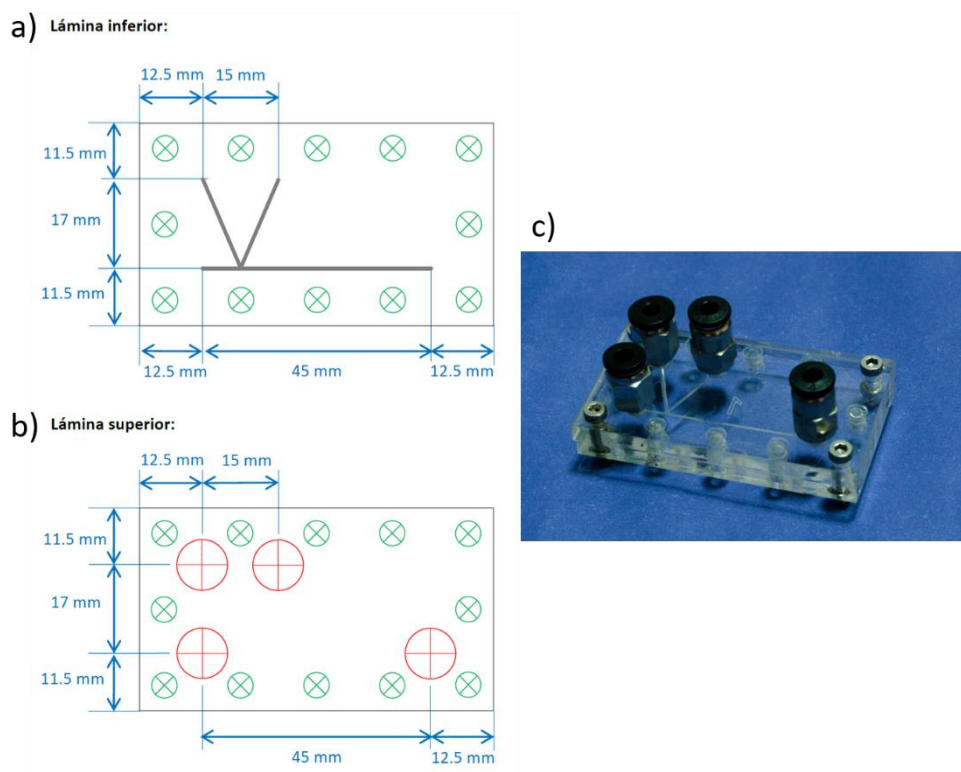


**Figura 2.3. Micromezcladores de teflón. Unión tipo a) “Y” y b) “T”.**

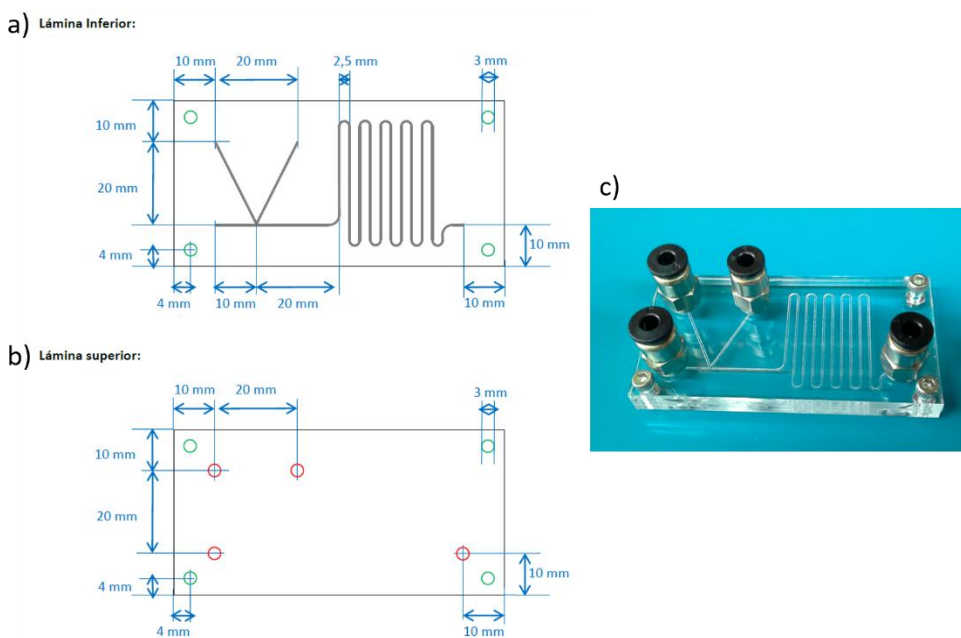
- Micromezcladores de acrílico con unión tipo “K”:

En el Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC, Santa Fe) se construyeron tres prototipos con juntas en forma de K (Figura 2.4, 2.5 y 2.6) para la alimentación simultánea de dos corrientes reaccionantes a la zona de formación de microgotas. Se utilizaron láminas de acrílico cristalino de 4 mm espesor (Alfredo Berca, ACRIMEV, Santa Fe). Los canales con perfil en forma de pirámide truncada y las conexiones se micro-maquinaron con láser de CO<sub>2</sub>. Las láminas se pegaron usando sensibilización con solvente y posterior aplicación de presión y temperatura [6]. Se utilizaron conectores neumáticos roscados para mangueras de 4 mm de diámetro externo (Figura 2.4-c y 2.5-c). El primer prototipo consistió en un micromezclador con canal de salida en forma recta (Figura 2.4) y el segundo con canal de salida en forma de serpentina (Figura 2.5). Ambos se conectaron a través de la lámina superior del dispositivo a tuberías plásticas de entrada y salida de un diámetro interno de 2 mm.

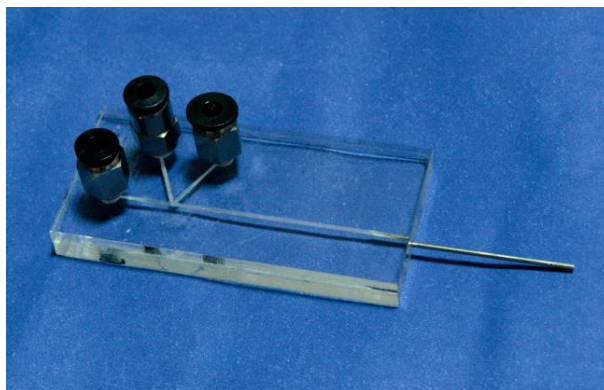
El tercer prototipo también con junta tipo “K” y canal recto se diseñó con salida lateral y conexión a la tubería de teflón con 1 mm de diámetro interno (Figura 2.6).



**Figura 2.4.** Micromezclador de acrílico con unión tipo “k”. Canal de salida en forma recta.



**Figura 2.5.** Micromezclador de acrílico con unión tipo “k”. Canal de salida en forma de serpentina.



**Figura 2.6. Micromezclador de acrílico con unión tipo “k”. Canal de salida lateral.**

## 2.2. Caracterización

### 2.2.1. Espectroscopia de absorción UV-visible (UV-vis)

La espectroscopia de absorción UV-vis es una técnica espectroscópica que trabaja con luz ultravioleta y la región espectral visible. Se basa en iluminar la muestra con un haz policromático, de manera que parte de la radiación es absorbida, y el resto, es transmitida. A través del detector se compara la intensidad de la luz transmitida por la muestra con la intensidad de la luz transmitida desde un material de referencia. A partir de esto se obtiene la intensidad de luz absorbida por la muestra permitiendo identificar o cuantificar diferentes compuestos.

En el caso de las nanopartículas metálicas, la espectroscopia UV-vis brinda información sobre la resonancia del plasmon de superficie (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*). Cuando un haz de luz incide sobre una muestra conteniendo nanopartículas metálicas, se induce la excitación colectiva de los electrones libres presentes en la banda de conducción de la superficie de las partículas. Como consecuencia a esta fuerte interacción con la luz incidente, se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas. Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación; a este fenómeno se lo llama SPR y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir frecuencias no absorbidas que se asocian a un color determinado. Este efecto de

resonancia se origina cuando el tamaño de las nanopartículas es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente ( $d \ll \lambda$ ).

Por lo tanto, el interés en este efecto es la posibilidad de utilizarlo como un marcador óptico indicativo de la presencia de nanopartículas metálicas. En particular, el pico de absorción del SPR para las AgNp se pone de manifiesto alrededor de los 420 nm y para las CuNp 570 nm.

Se utilizaron dos equipos; (i) un Varian Cary® 50 UV-Vis Spectrophotometer del Instituto de Nanociencia de Aragón, Zaragoza, España.; (i) un Perkin Elmer Lambda 20 (Figura 2.7) del Laboratorio Modelo de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL (LaMoFIQ). Ambos cuentan con dos fuentes de radiación y cubren el rango de longitud de onda de trabajo de 190 a 1100 nm.

Para realizar las mediciones las suspensiones de nanopartículas se diluyeron con agua destilada (referencia) y se colocaron en cubetas de cuarzo Suprasil (Serie 100-QS, paso luz 10 mm, capacidad 3.500 µl, dimensiones 45 x 12,5 x 12,5 mm).



**Figura 2.7. Espectrofotómetro UV-vis. Perkin Elmer Lambda 20.**

### 2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica que aporta información sobre la forma y tamaño de partículas. La técnica de TEM se basa en el impacto de la muestra con un haz de electrones producidos por un cañón situado en la parte superior del microscopio. Los electrones emitidos desde un filamento pasan a través de una gran diferencia de potencial (voltaje de aceleración) y adquieren energía cinética. Antes de

alcanzar la muestra el haz de electrones es modificado por lentes condensadoras para mejorar la coherencia del haz. La imagen se forma a partir de la interacción de los electrones transmitidos a través de la muestra. Una lente objetivo, situada debajo y alrededor de la muestra focaliza los haces dispersados y forma la primera imagen intermedia. Esta imagen luego es aumentada por una serie de lentes proyectoras para llegar a ser visible en la pantalla fluorescente.

El equipo utilizado ha sido un Microscopio Modelo FEI Tecnai T-200 (Figura 2.9) operado a 200 keV perteneciente al Instituto de Nanociencia de Aragón, Zaragoza, España.

Las muestras se prepararon a partir de la dilución con agua destilada de las suspensiones de nanopartículas, colocando 5  $\mu\text{l}$  sobre una rejilla (C-flat™ Holey Carbon Grids).

La distribución del tamaño de las nanopartículas coloidales resultantes se determinó a partir de micrografías ampliadas, utilizando el software libre ImageJ [7] contando al menos 200 partículas. La distribución de tamaño se evaluó mediante histogramas y diagrama de caja.



**Figura 2.9. Microscopio electrónico de transmisión.** Microscopio Modelo FEI Tecnai T-200.

### 2.2.3. Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) permite analizar el diámetro de partículas en suspensión y su distribución. La técnica se basa en iluminar la suspensión con un haz

láser y analizar la fluctuación de intensidades de la luz dispersada por las partículas suspendidas.

Las partículas en suspensión se encuentran en continuo movimiento debido al movimiento Browniano dado por las colisiones aleatorias con las moléculas del líquido que rodean las partículas. El equipo detecta la diferencia entre el movimiento de las partículas grandes y las pequeñas. La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debida al movimiento Browniano está definida por la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 2):

$$d_t = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_0} \quad \text{Ec. 02}$$

donde  $d_t$  es el coeficiente de difusión traslacional de las partículas de diámetro  $D_0$ ,  $k_B$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad del medio.

Debido al constante movimiento de las partículas en suspensión, la intensidad de la luz dispersada es variable. Por lo tanto el equipo de medición de DLS cuenta con un correlador digital que mide el grado de fluctuación de la intensidad en un periodo de tiempo. A través de esta función de correlación se relaciona el tamaño de partículas teniendo en cuenta que las de mayor tamaño se mueven más lento y por lo tanto el grado de fluctuación resulta menor y que, por el contrario, las partículas más pequeñas se mueven más rápido y el grado de fluctuación es mayor.

Los datos obtenidos con de las mediciones de dispersión de luz son analizados mediante el método de “cumulantes”. Este es un método estándar que proporciona información sobre los cumulantes y los momentos de la distribución del decaimiento del grado de fluctuación. El análisis de cumulantes proporciona dos valores, un valor medio para el tamaño y un parámetro de ancho conocido como polidispersidad o índice de polidispersidad (IPD). Es importante tener en cuenta que este tamaño medio es un promedio de intensidad, no es una media de masa o número porque se calcula a partir de la intensidad de la señal. Por otro lado, el IPD es un valor adimensional que adquiere valores de 0 a 1 y es un indicador del grado de agregación en las partículas. Valores cercanos a cero denotan un sistema monodisperso; en cambio, valores superiores a 0,5

reflejan sistemas polidispersos con una amplia distribución de tamaños y, por lo tanto, una mayor tendencia a la agregación. [8-10].

El equipo utilizado fue el Zetasizer Nano ZS90 (Figura 2.8) que cuenta con un láser rojo (He-Ne, 4.0 mW, 633nm), determina la luz dispersada a 90° y el rango de tamaños es de 2 nm a 3  $\mu\text{m}$ .

Para realizar las mediciones las suspensiones de nanopartículas se diluyeron con agua destilada y se colocaron en cubetas de poliestireno Sarstedt (dimensiones 10 x 10 x 45 mm).



**Figura 2.8. Dispersión de luz dinámica. Zetasizer Nano ZS90.**

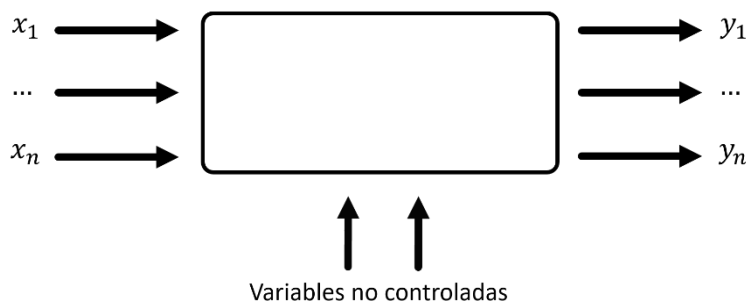
### 2.3. Diseño experimental

El diseño experimental es una herramienta estadística que permite identificar y cuantificar las causas (variables dependientes o factores, x) de un efecto (respuestas, y) dentro de un estudio experimental (Figura 2.10). En el diseño experimental se manipulan deliberadamente uno o más factores para medir el efecto que tienen sobre las respuestas de interés. Describe cuáles son los factores que se deben tratar, de qué manera, cuántas veces se debe repetir el experimento y en qué orden para poder establecer, con un grado de confianza predefinido, la necesidad de una presunta relación de causa-efecto [11].

De manera general, el diseño experimental se utiliza para caracterizar un proceso, solucionar problemas y cuantificar errores. En cada caso el elemento común en la aplicación del diseño experimental es el cambio intencional que se ejerce sobre los



factores, aunque el valor agregado es la eficiencia proporcionada por el enfoque estadístico de la experimentación [12].



**Figura 2.10. Esquema de las variables implicadas en el diseño experimental.**  $x_n$ : variables dependientes o factores,  $y_n$ : respuestas.

Una vez seleccionadas las variables a estudiar se establece un determinado diseño con el objetivo de estimar la influencia de las diferentes variables sobre las respuestas. Un diseño factorial arroja información sobre la influencia de todos los factores y los efectos de las interacciones de estos sobre las respuestas. Una combinación de  $k$  factores a dos niveles dará como resultado un diseño factorial con un número  $2^k$  experimentos. Los niveles de los factores están dados por el valor mínimo y el máximo del rango a evaluar. Además se incluye un valor central en el cual todas las variables toman el valor medio del rango. Incluir tres o cuatro experimentos centrales en los diseños factoriales minimiza el riesgo de perder relaciones no lineales en el medio de los intervalos y la repetición permite la determinación de intervalos de confianza. Los valores mínimos y máximos de cada variable se definen a partir de lo que se supone que es una variación razonable a estudiar [13].

El diseño experimental se aplicó en esta tesis con el fin de estudiar, en un caso, las variables influyentes y las posibles interacciones entre ellas en la síntesis de CuNp empleando ácido ascórbico (AA) como reductor (Capítulo 5). Los factores a analizar se establecieron en función de la información reportada en bibliografía y de resultados previos. Se seleccionaron la concentración de AA, la concentración del estabilizante (PVP), la temperatura y el pH. Como respuestas se estudió la cantidad de precipitado, tamaño hidrodinámico de las partículas (DLS) y la señal SPR (UV-vis).

Para el diseño se utilizó una versión libre de prueba del programa Design Expert®. Se seleccionó un diseño factorial de nivel 2 con 4 puntos centrales. Una vez obtenido los resultados de las diferentes respuestas se analizó la correlación de los factores para determinar posibles interacciones entre ellos y evaluar cuáles son los más influyentes. Luego se estableció un modelo que relaciona los factores influyentes con las respuestas estudiadas y con este fué posible predecir las respuestas a partir de variaciones sobre los factores.

### 2.4. Actividad bactericida

#### 2.4.1. Modelo de Bacteria

La bacteria que se utilizó como modelo en los experimentos bactericidas ha sido *Escherichia coli* cepa DH5- $\alpha$ . *E. coli* (Figura 2.10) se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, aunque puede estar presente en todos lados, dado que es un organismo ubicuo. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram (-), gramnegativo), es anaerobio facultativo y móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo).



**Figura 2.10. Foto de microscopía electrónica de barrido de *E. coli*. Magnificación: 3200 veces. Fuente: S. Lowry/Univ Ulster/gettyimages® [14].**

#### 2.4.2. Medios de cultivo

- Tampón fosfato salino

Las diluciones que se han realizado en todos los protocolos que se describen más adelante se realizan en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) que tiene la siguiente composición (Tabla 2.2):

**Tabla 2.2.** Composición PBS

Sustancia	Cantidad (g/L)
NaCl (Cicarelli)	8,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merk)	2,14
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	0,5
pH	7

- Medios de cultivo

Para realizar los cultivos líquidos en los ensayos bactericidas se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio LB: utilizado para obtener los cultivos estacionarios (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Composición del medio nutritivo LB

Sustancia	Cantidad (g/L)
Peptona de carne (Britania)	10
Extracto de levadura (Britania)	5
NaCl (Cicarelli)	10
pH	7

Para realizar el recuento en placa, se usaron placas Petri estériles con el siguiente medio de cultivo agar:

Medio LB agar: Medio sólido utilizado para el recuento de colonias en placa de petri (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.** Composición del medio LB agar

Sustancia	Cantidad (g/L)
Peptona de carne (Britania)	10
Extracto de levadura (Britania)	5
NaCl (Cicarelli)	10
Agar	15
pH	7

### 2.4.3. Actividad bactericida

Para determinar la capacidad bactericida de las nanopartículas se utilizó el método de dilución en placa. Para ello, una alícuota de la suspensión de las de nanopartículas se enfrentó a 10 mL de cultivo estacionario de *E. coli*, con una concentración aproximada de  $10^6$  unidades formadoras de colonias/mL (CFU/mL, del inglés *colony forming unit*). Se incubaron en estufa a 37 °C durante 20 h. Luego se realizaron siete diluciones sucesivas 1:10 en PBS de cada una de las muestras incubadas, se sembraron tres gotas de 25 µl en placas de LB agar y finalmente se incubaron durante la noche (ON, del inglés *over night*) a 37 °C. A partir de los cultivos sólidos obtenidos se procedió al recuento en placa para determinar la concentración bacteriana resultante. En paralelo se realizó el mismo procedimiento con 10 mL cultivo con  $10^6$  CFU/mL y con 10 mL de medio LB, como controles positivo (+) y negativo respectivamente (-).

### 2.4.4. Análisis de resultados de actividad bactericida

Para el diseño de las gráficas y el análisis estadístico de los datos se empleó el programa GraphPad. Los datos fueron comparados utilizando pruebas no paramétricas mediante el test de Mann-Withney. Las diferencias entre las medianas fueron consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 2.5. Bibliografía

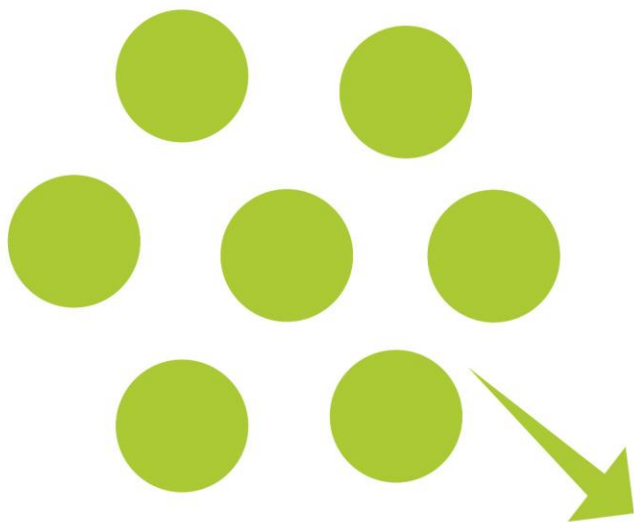
1. Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S.L., *Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125 (46): p. 13940.
2. Tang, X.-F., Yang, Z.-G., Wang, W.-J., *A simple way of preparing high-concentration and high-purity nano copper colloid for conductive ink in inkjet printing technology*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**. 360 (1): p. 99.
3. Xiong, J., Wu, X.-d., Xue, Q.-j., *Biomolecule-assisted synthesis of highly stable dispersions of water-soluble copper nanoparticles*. Journal of Colloid and Interface Science, **2013**. 390 (1): p. 41.
4. Singh, M., Sinha, I., Premkumar, M., Singh, A.K., Mandal, R.K., *Structural and surface plasmon behavior of Cu nanoparticles using different stabilizers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**. 359 (1-3): p. 88.
5. Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., Wu, X., *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid*. Green Chemistry, **2011**. 13 (4): p. 900.
6. Liga, A., Morton, J.A.S., Kersaudy-Kerhoas, M., *Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices*. Microfluidics and Nanofluidics, **2016**. 20 (12): p. 164.
7. ImageJ. 1997 [Último acceso: **2018**]; Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.
8. Frisken, B.J., *Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data*. Applied Optics, **2001**. 40 (24): p. 4087.
9. Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K.J., Nair, B.U., *Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates*. Bulletin of Materials Science, **2008**. 31 (1): p. 93.
10. Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K., *Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy*. Journal of Controlled Release, **2004**. 95 (2): p. 217.
11. Box, G.E.P., Hunter, J.S., Hunter, W.G., *Statistics for experimenters: Design, innovation, and discovery*. 2nd ed. Vol. 101. **2006**, Hoboken, N.J. 664.
12. Barker, T.B., Milivojevic, A., *Quality by experimental design*. 4th ed. **2016**, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300: Chapman and Hall/CRC 724.
13. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., Bergman, R., *Experimental design and optimization*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **1998**. 42 (1): p. 3.

14. Lowry, S. *SEM of Escherichia coli bacteria*. [Último acceso: **2019**]; Disponible en: <https://www.gettyimages.com>.

## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



### 3. NANOPARTÍCULAS DE PLATA





## Capítulo 3 : Nanopartículas de plata

---

En este capítulo se propone un protocolo para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNp) en presencia de glucosa y almidón utilizados como agente reductor y estabilizante, respectivamente. La combinación del uso de reactivos compatibles con el ambiente y con el uso de microrreactores para lograr una producción continua de AgNp se planteó como objetivo principal. Para ello se realizó la comparación sistemática entre el sistema discontinuo y continuo. En primer lugar se estudiaron los efectos de las condiciones de reacción sobre la respuesta óptica, la morfología y la distribución de tamaño de las AgNp. Luego se evaluó la estabilidad coloidal a largo plazo monitoreando las características de las nanopartículas a distintos tiempos de almacenamiento.

### 3.1. Síntesis en sistema discontinuo y continuo

La síntesis de AgNp se realizó modificando un protocolo previamente publicado por Raveendran y col. [1]. Por un lado, la síntesis en discontinuo se llevó a cabo mezclando una solución de  $\text{AgNO}_3$  (0,01 M) con una solución de almidón (0,17% p/v) y glucosa para lograr relaciones molares plata/glucosa ( $r = \text{Ag}/\text{glucosa}$ ) de 5/1; 1/1 y 1/5. El tiempo de reacción se fijó 6 h en contraste con las 20 h empleadas en el protocolo de referencia. El sistema se agitó magnéticamente en un balón sumergido en un baño termostático de glicerina en condiciones de reflujo con el que se fijaron las temperaturas de reacción: 40, 55 y 70°C. Por otro lado, para la síntesis continua, se utilizó el micromezclador interdígital de acero inoxidable (Figura 3.1). Dos soluciones madres, una conteniendo la solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  y la otra la mezcla acuosa de reductor-estabilizador (glucosa-almidón) se colocaron en dos jeringas separadas y se bombearon al micromezclador con 8,8 ml/h como caudal total, resultando un tiempo de residencia de 9 min. El micromezclador y la tubería de envejecimiento se sumergieron en un baño termostático de glicerina para controlar la temperatura de reacción. El tiempo de reacción en ambas configuraciones (discontinuo y continuo) se estableció mediante observaciones macroscópicas tras evaluar la aparición del color amarillento atribuible a la formación de AgNp, a una temperatura de reacción de 40°C y una relación  $r = 1/1$ . Una vez seleccionado el tiempo de residencia se estudiaron diferentes temperaturas de reacción (40°C, 55°C y 70°C) y relaciones Ag/glucosa ( $r = 5/1$ , 1/1 y 1/5) para evaluar el efecto de

estas condiciones sobre la respuesta óptica (resonancia del plasmón de superficie, SPR), la morfología y distribución de tamaños de las AgNp. La Tabla 3.1 resume todas las condiciones de reacción exploradas y la nomenclatura correspondiente asignada a cada muestra de AgNp según los parámetros de síntesis.



**Figura 3.1. Síntesis de AgNp en sistema continuo. Reductor: Glucosa. Precursor:  $\text{AgNO}_3$ .** Esquema de síntesis en continuo con micromezclador interdígital de acero inoxidable.

**Tabla 3.1. Muestras de AgNp.** Resumen de las diferentes condiciones de síntesis y la nomenclatura correspondiente asignada a las suspensiones de AgNp obtenidas con cada parámetro.

Relación de reactivos ([Ag]/[glucosa])	Temperatura de reacción (°C)					
	T=40		T=55		T=70	
	B	C	B	C	B	C
<b>1</b> ( $r = 5/1$ )	B40_1	C40_1	B55_1	C55_1	B70_1	C70_1
<b>2</b> ( $r = 1/1$ )	B40_2	C40_2	B55_2	C55_2	B70_2	C70_2
<b>3</b> ( $r = 1/5$ )	B40_3	C40_3	B55_3	C55_3	B70_3	C70_3

B: Sistema discontinuo, tiempo de residencia 6h, C: Sistema Continuo, tiempo de residencia: 9 min. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se denominaron "a" o "b" al final del código utilizado.

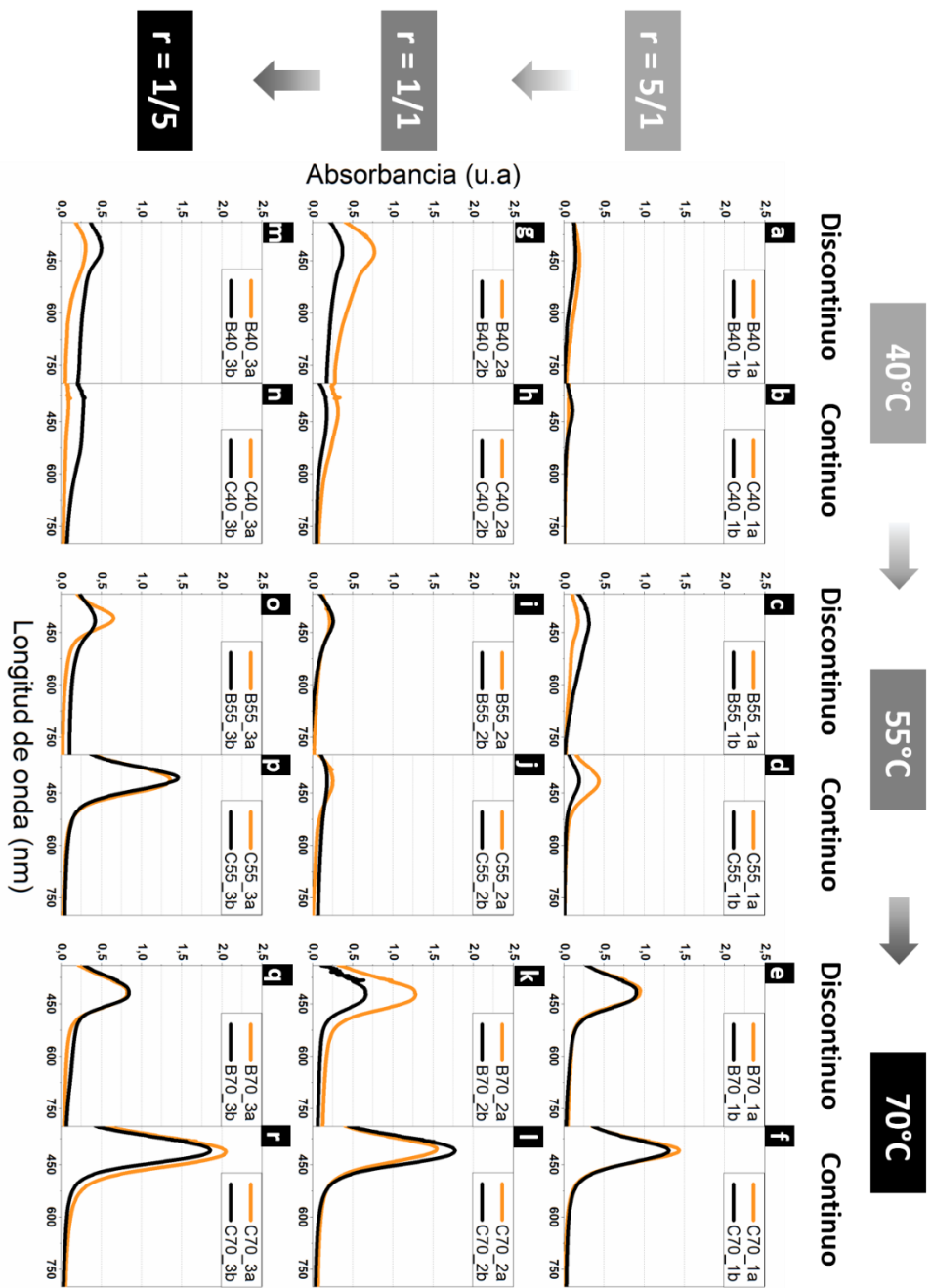
Por último, las suspensiones se mantuvieron en condiciones ambientales durante 48 meses para evaluar la estabilidad de las AgNp. Se almacenaron en tubos tipo Eppendorf sin ninguna precaución específica (es decir, sin protección contra la luz) y se evaluaron sistemáticamente en diferentes puntos temporales.

### 3.2. Influencia de la temperatura y la relación de reactivos

La Figura 3.2 muestra los espectros de UV-vis de las suspensiones tomadas en el día de síntesis ( $t_0$ ). Las AgNp se prepararon por duplicado (etiquetadas como "a" o "b" en la nomenclatura estándar, Tabla 3.1) mediante síntesis discontinua (B) y continua (C) a diferentes temperaturas de reacción y relaciones molares de reactivos ( $r$ ).

En todos los casos el plasmón (SPR) presenta un máximo alrededor de 420 nm (Figura 3.2) y se observa que los espectros fueron reproducibles en todas las condiciones de síntesis. La Figura 3.2 muestra que la temperatura, junto con la configuración del dispositivo de reacción, resultó un factor relevante que influye en la respuesta óptica de las suspensiones. Los experimentos desarrollados a 40°C y 55°C exhibieron una banda de absorción amplia con una señal de SPR de baja intensidad alrededor de 420 nm (Figuras 3.2 a-d, 3.2 g-j y 3.2 m-o), sugiriendo la presencia de AgNp polidispersas. Este efecto es más significativo en las suspensiones sintetizadas en discontinuo. Sin embargo, a mayor temperatura (70°C) se observan espectros más estrechos e intensos. Esto induce a concluir que a 70°C el avance de la reducción es mayor y se favorecen los eventos de nucleación en el seno de la suspensión.

En la Tabla 3.2 y la Figura 3.4 se muestran resultados del análisis de las imágenes de TEM de los tamaños y distribuciones de tamaños de las muestras a  $t_0$ . A su vez, para facilitar el análisis comparativo de los tamaños de partículas entre ambos sistemas, se realizó un análisis aplicando el método de diagrama de caja (Figura 3.3). La línea horizontal dentro del cuadro representa la mediana, la parte superior e inferior del cuadro representan los cuartiles superior e inferior, y la longitud vertical del cuadro, desde los cuartiles superiores a los inferiores, es el rango intercuartílico y, por tanto, el 50% de todos los casos tienen valores dentro del cuadro. Las líneas, llamadas "bigotes", se dibujan desde el borde de la caja a los valores máximo y mínimo.

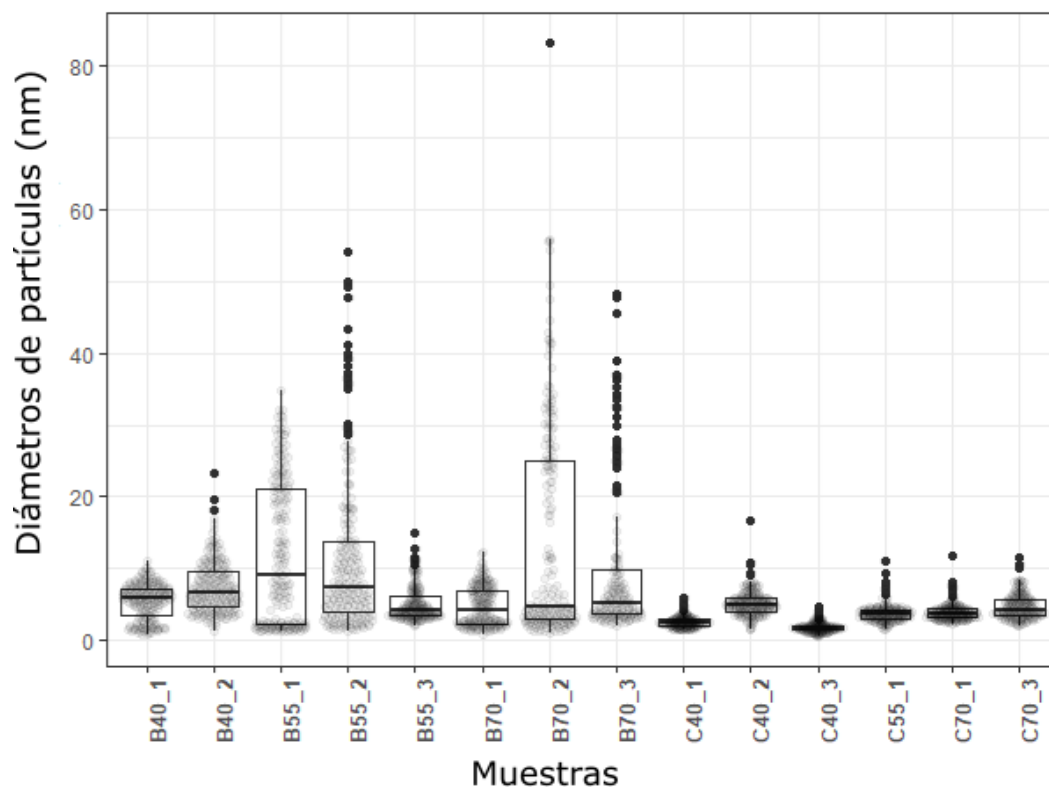


**Figura 3.2. Influencia de la temperatura y relación de reactivos. Espectro UV-vis de las AgNp sintetizadas en sistema discontinuo y continuo por duplicado (a y b) en el día de la síntesis (t<sub>0</sub>). Condiciones de reacción: Tabla 3.1.**

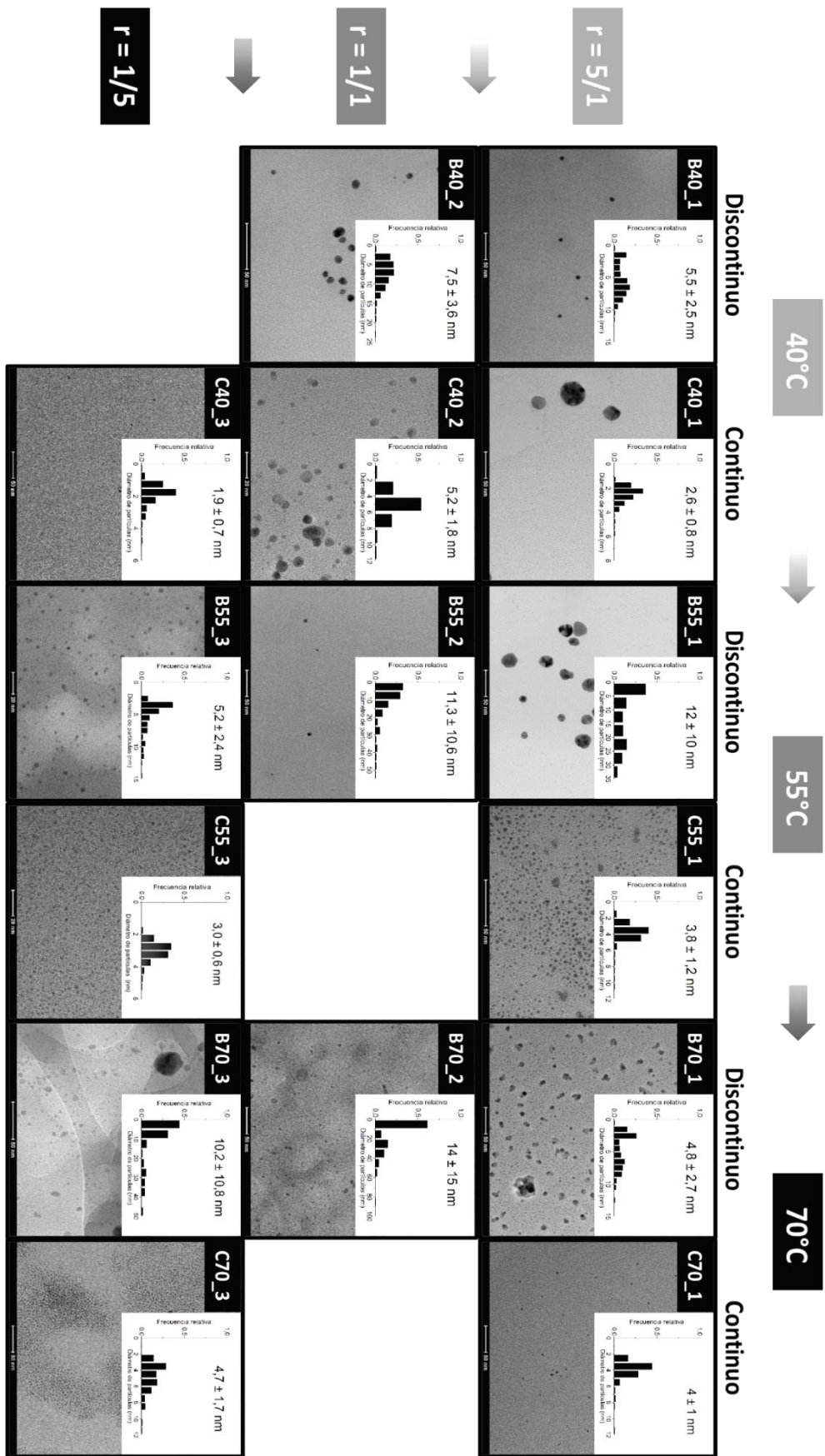
**Tabla 3.2. Distribución de tamaño de partículas (nm) evaluados a distintos tiempos de almacenamiento.** Las medidas se realizaron mediante imágenes TEM a  $t_0$ : día de síntesis y  $t_3$ : 48 meses de almacenamiento.

		B		C			B		C			B	C
40_1	$t_0$	5,5 ± 2,5	2,6 ± 0,8	55_1	$t_0$	12 ± 10	3,8 ± 1,2	70_1	$t_0$	4,8 ± 2,7	4 ± 1		
	$t_3$	5,9 ± 10,3	nd		$t_3$	nd	48,3 ± 73,1		$t_3$	2,0 ± 1,9	6,3 ± 9,2		
40_2	$t_0$	7,5 ± 3,6	5,2 ± 1,8	55_2	$t_0$	11,3 ± 10,6	nd	70_2	$t_0$	14 ± 15	nd		
	$t_3$	nd	5,7 ± 1,9		$t_3$	nd	4,2 ± 1,4		$t_3$	14,3 ± 15,3	5,1 ± 6,9		
40_3	$t_0$	nd	1,9 ± 0,7	55_3	$t_0$	5,2 ± 2,4	nd	70_3	$t_0$	10,2 ± 10,8	1,7 ± 1,7		
	$t_3$	3,7 ± 1,8	nd		$t_3$	nd	nd		$t_3$	14,0 ± 21,8	4,3 ± 5,4		

nd: No disponible.



**Figura 3.3. Influencia de la temperatura y relación de reactivos.** Distribución de tamaños mediante diagrama de caja de las AgNp recién preparadas ( $t_0$ ).



**Figura 3.4. Influencia de la temperatura y relación de reactivos. Imágenes de TEM de las AgNp sintetizadas a  $t_0$  en sistema discontinuo y continuo a 40, 55 y 70 °C con  $r = 5/1$ ,  $1/1$  y  $1/5$ .**

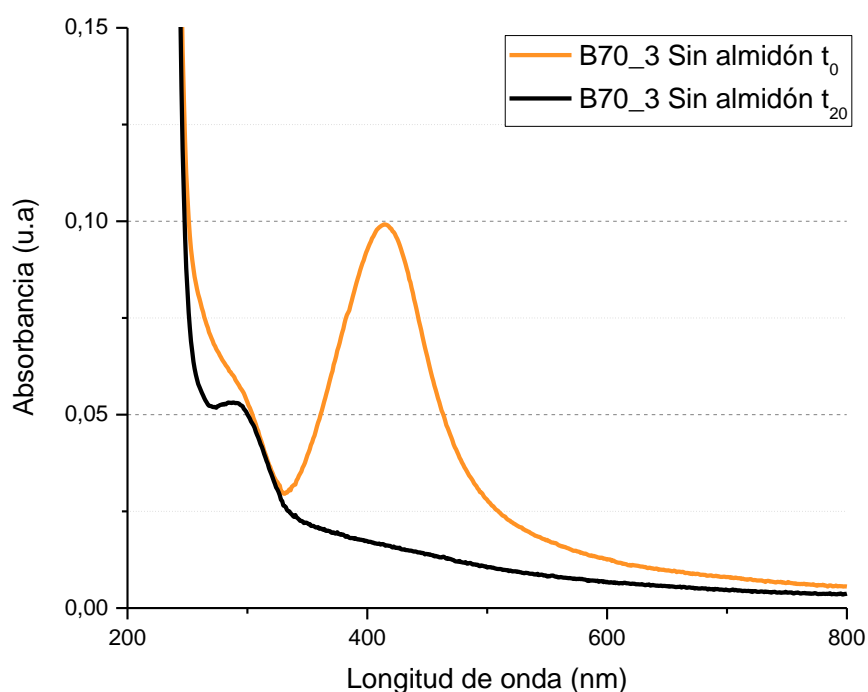
A partir de estos resultados se observa que en las muestras preparadas a  $t_0$  la distribución no fue homogénea en el reactor discontinuo a 40, 55 o 70°C, independientemente de las relaciones de precursor. Por el contrario, la configuración continua dio lugar a distribuciones de tamaños monodispersas cuando la reacción se llevó a cabo a 55 y 70°C para todos los valores de  $r$  (Tabla 3.2, la Figuras 3.3 y 3.4).

Estos resultados están de acuerdo con hallazgos previos reportados en la literatura. Por ejemplo, Jiang y col. [2] estudiaron la reducción sinérgica de  $\text{AgNO}_3$  utilizando tres agentes reductores (ácido cítrico, ácido L-ascórbico y el  $\text{NaBH}_4$ ) a diferentes temperaturas (0, 17, 23, 28, 32, 38, 43 y 50 °C). Observaron que temperaturas bajas (aproximadamente 0°C) podrían inhibir significativamente tanto la formación de partículas como los procesos de crecimiento. En cambio, en el rango de temperatura de 17 a 55°C observaron que la velocidad de reacción y el tamaño de las partículas se incrementan. En este sentido, Bonato y col. [3] también encontraron una influencia importante de la temperatura de reacción (75°C) sobre el efecto reductor del extracto de cáscaras de nuez de anacardo (*Anacardium occidentale*) en la síntesis de AgNp. Mientras que, Vigneshwaran y col. [4] señalaron que a 120°C la reacción de reducción  $\text{AgNO}_3$  y almidón se acelera por la presencia de grupos funcionales aldehído, que están presentes en las moléculas de este carbohidrato.

El efecto de la temperatura en la síntesis de AgNp resultó más evidente cuando se utilizó el sistema continuo. En efecto, a 70°C, los espectros UV-vis proporcionaron un plasmón más estrecho y con mayor intensidad (Figuras 3.2-f, 3.2-l y 3.2-r) respecto a los obtenidos a 55°C (Figuras 3.2-d, 3.2-j y 3.2-p) y 40°C (Figuras 3.2-b, 3.2-h y 3.2-n). Este resultado se atribuye a las condiciones de reacción inherentes al micromezclador que conduce a una distribución de temperatura más homogénea y una mezcla de reactivos más eficiente. Trabajos previos corroboraron que los microrreactores aumentan la monodispersidad de las nanopartículas resultantes, al tiempo que reducen el consumo de reactivos [5, 6].

La influencia de la glucosa como agente reductor se evaluó variando sistemáticamente las relaciones molares Ag/glucosa ( $r$ ) en el proceso de síntesis (Tabla 3.1 y Figura 3.2). Teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción de reducción ( $r = 2/1$ ) [7], se propuso una relación en defecto de reductor ( $r = 5/1$ ) y dos en exceso ( $r = 1/1$  y  $1/5$ ).

En primer lugar se evaluó el posible poder reductor del almidón y su capacidad como estabilizante. Para corroborar este efecto, la síntesis de AgNp a 70°C y  $r = 1/5$  se realizó en ausencia de almidón, la intensidad del espectro UV-vis resultó inferior a la correspondiente a la síntesis que contiene el estabilizante (Figura 3.5), sugiriendo que el almidón tiene la capacidad reductora. Por otro lado, esta suspensión después de 20 días de almacenamiento presentó un precipitado con partículas grandes y el correspondiente UV-vis indica ausencia del plasmón característico de las AgNp y aparece la señal asignada a la plata iónica a 288 nm. Por lo tanto, estos resultados confirman el papel del almidón como estabilizador y agente reductor. También vale la pena mencionar que la intensidad de la señal SPR también fue mucho más fuerte en presencia de almidón que en su ausencia (Figuras 3.2 y 3.5, respectivamente).



**Figura 3.5. Efecto del almidón sobre la reducibilidad de la plata y la estabilidad de las AgNp.** Espectros UV-vis de AgNp preparadas en ausencia de almidón evaluados el día de la síntesis ( $t_0$ ) y luego de 20 días ( $t_{20}$ ).



El-Rafie y col. [8] evaluaron el almidón de maíz como reductor y estabilizador para generar AgNp en condiciones alcalinas. Estos autores compararon el potencial redox de la glucosa y el almidón en rangos de temperatura de reacción de 50-80°C e identificaron una fuerte capacidad reductora de la glucosa en comparación con el almidón y la fructosa. Aunque el almidón es un carbohidrato no reductor, esos autores mostraron que las condiciones alcalinas promovían la descomposición de las cadenas poliméricas del almidón en fragmentos con efectos reductores. Además, el aumento de la temperatura a 60 y 80°C también produce un aumento del potencial redox del almidón. En consecuencia, la temperatura podría desempeñar un papel importante en la aceleración de la reacción de reducción y en la mayor producción de fragmentos reductores procedentes del almidón. Por otro lado, también concluyeron que el uso de reductores fuertes conduce a nanopartículas más pequeñas y menos polidispersas, mientras que las condiciones de reducción más suaves dan como resultado menores tasas de reducción. En este sentido, Batabyal y col. [7] observaron que el almidón no reduce los iones de Ag presentes en una solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente. En general, está bien establecido que el almidón forma glucosa como principal producto de la hidrólisis cuando se somete a tratamientos hidrotérmicos [7]. Estas evidencias están de acuerdo con nuestras observaciones.

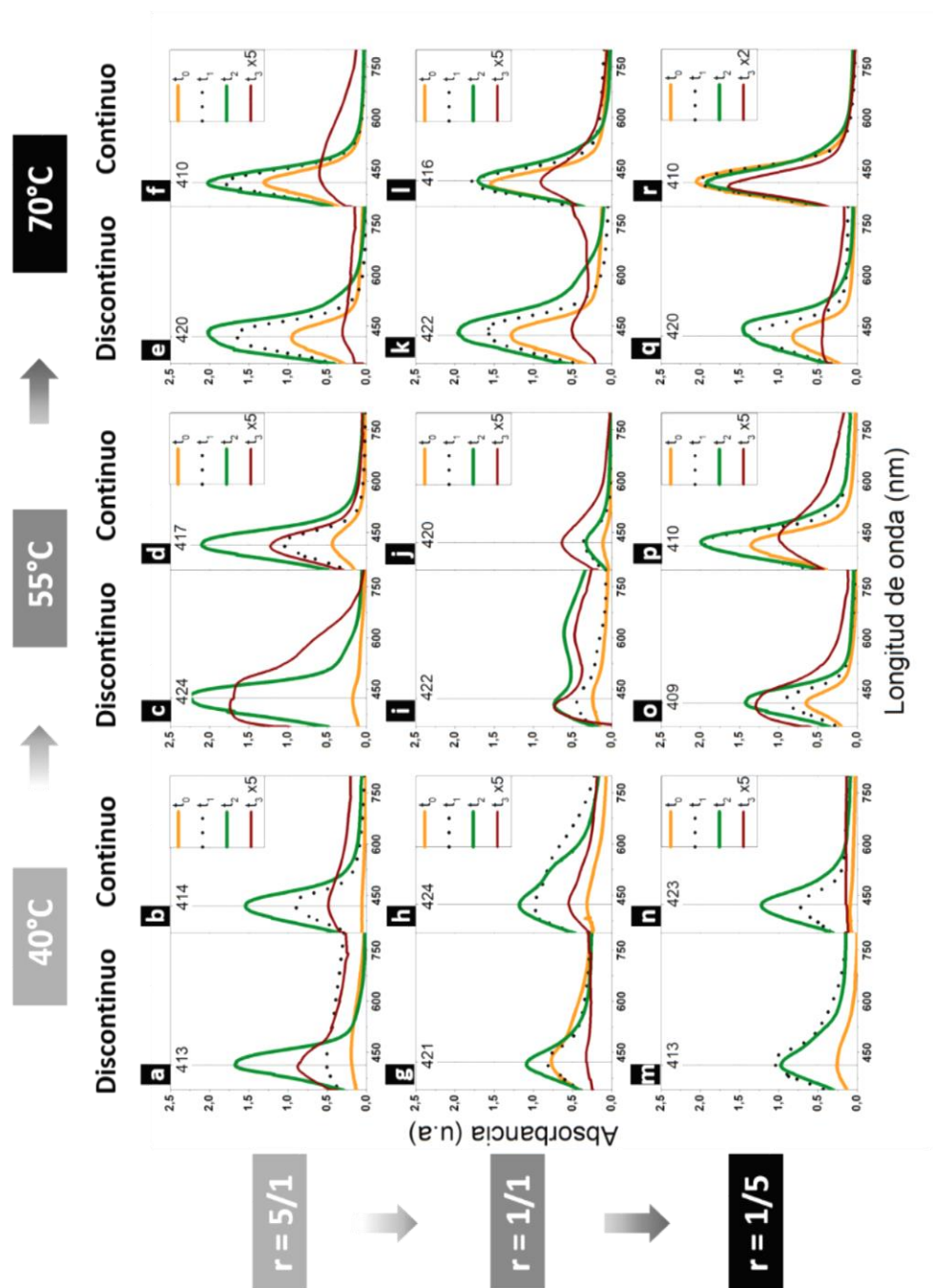
Finalmente, tras evaluar las diferentes relaciones de reactivos, en condiciones discontinuas se observa una ligera tendencia que muestra un aumento en la intensidad de la señal SPR cuando la reacción ocurre con exceso de glucosa (Figura 3.2-o). Los experimentos realizados con menor concentración de reductor mostraron que la reducción tuvo lugar principalmente a las temperaturas de reacción más altas (Figuras 3.2-e y 3.2-f), reforzando así el papel potencial del almidón como agente co-reductor. Notablemente, este efecto parece ser aún más evidente con la configuración de flujo continuo. En contraste con la configuración en discontinuo, el microrreactor induce a una mezcla más íntima y homogénea de los reactivos [5, 6, 9], especialmente a 70°C. Una mezcla precursora más eficiente puede conducir a un mejor recubrimiento superficial de los cristales en crecimiento con estabilizador orgánico, controlando la difusión de moléculas sobre estos y generando nanopartículas con una distribución de

tamaño homogénea y, por lo tanto, señales de SPR más estrechas (Figuras 3.2-f, 3.2-l, 3.2-r, 3.3 y 3.4).

### 3.3. Evaluación de la estabilidad luego de largos períodos de almacenamiento.

La espectroscopia UV-vis se usó como un método simple y confiable para controlar la estabilidad de las suspensiones de nanopartículas a diferentes intervalos de tiempo. La Figura 3.6 muestra la evolución de SPR para las diferentes suspensiones de AgNp preparadas en discontinuo y continuo, respectivamente. Los espectros se obtuvieron después de almacenar las muestras en condiciones ambientales durante 8, 32 y 48 meses ( $t_1$ ,  $t_2$  y  $t_3$ , respectivamente). En el caso de la síntesis en discontinuo, la intensidad de SPR aumentó progresivamente en el tiempo de envejecimiento, especialmente después de 32 meses. Esto sugiere que la reacción de reducción no se completó en el tiempo de residencia establecido o, que las nanopartículas más grandes podrían haberse disuelto parcialmente con el tiempo generando núcleos con los que se formaron nuevas partículas más pequeñas.

Las AgNp envejecidas siguieron una tendencia similar en el proceso continuo y la intensidad de la banda SPR fue mayor en  $t_1$  y  $t_2$  que la observada a  $t_0$ . Sin embargo, en este caso, las diferencias establecidas entre la intensidad de SPR en los tiempos iniciales  $t_0$  y  $t_2$  fueron mucho menos relevantes en comparación con los experimentos en discontinuo, especialmente a temperaturas y concentraciones de glucosas más altas (Figura 3.6-l y 3.6-r). En este contexto, la mejora de intensidad de SPR observada con el tiempo de envejecimiento cuando la concentración de glucosa es en defecto ( $r = 5/1$ ), podría atribuirse a la reacción de reducción entre iones de plata libres y unidades de glucosa generadas por la fragmentación del almidón [10]. Sin embargo, cuando la síntesis se realizó en condiciones de exceso de glucosa ( $r = 1/1$  y  $r = 1/5$ ), la diferencia entre la intensidad de SPR de  $t_0$  y  $t_2$  fue menor. Esto podría suceder porque los iones de plata podrían reducirse completamente en presencia de exceso de agente reductor. Además, el almidón podría mejorar la estabilidad durante los períodos de almacenamiento de 8 y 32 meses al mantener una atmósfera reductora, debido a su efecto combinado de estabilizador y agente co-reductor.

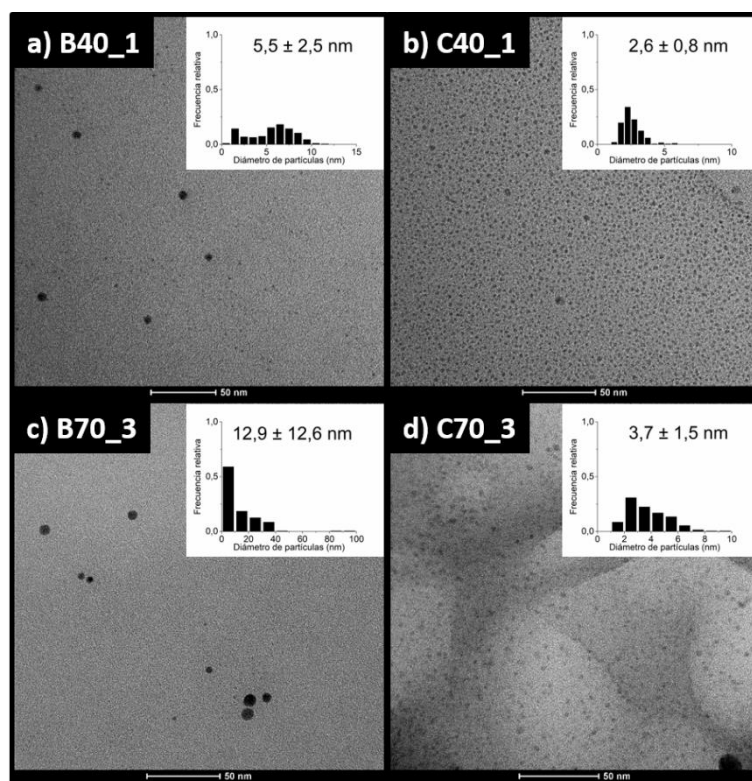


**Figura 3.6. Evaluación de la estabilidad coloidal de las AgNp luego de diferentes períodos de envejecimiento. Espectros de UV-vis de AgNp almacenadas a temperatura ambiente a  $t_0$ ,  $t_1$  (8 meses),  $t_2$  (32 meses) y  $t_3$  (48 meses). Los espectros a  $t_3$  se aumentaron 5 o 2 veces ( $t_3 \times 5$  o  $t_3 \times 2$ ) para resaltar las diferencias.**

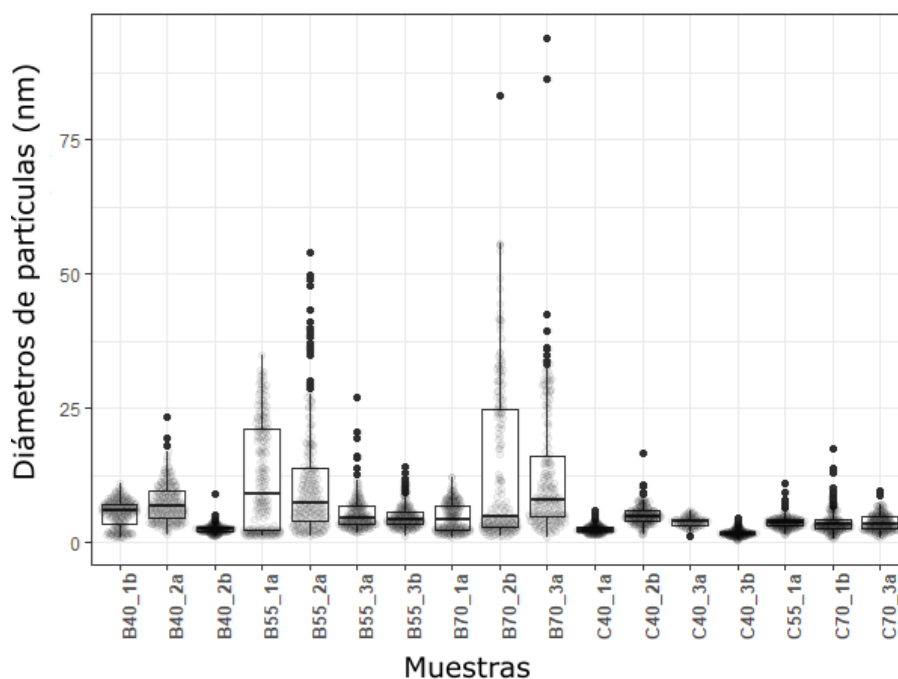
Estos resultados están de acuerdo con Chevion y col. [11] quienes demostraron la doble influencia del almidón en la suspensión de nanopartículas de plata, es decir, estabilizador y reductor. Estos autores, sintetizaron AgNp con y sin glucosa como agente reductor en presencia de almidón, y concluyeron que el tamaño y la polidispersidad de AgNp eran más elevados que cuando se agregaba glucosa. También observaron que la intensidad del plasmón aumenta mientras aumenta el tiempo de reacción, pero permanece más baja que la observada cuando la mezcla de reacción contiene glucosa.

En este sentido, podría sugerirse que la alta concentración de almidón conduce a una suspensión de AgNp más estable incluso durante períodos superiores a 30 meses y que el uso de una configuración de mezcla continua permite que este se logre en un período de reacción mucho más corto (horas vs. escala de tiempo de meses y años).

El análisis TEM de las muestras seleccionadas de AgNp después de 8 meses ( $t_1$ ) de almacenamiento también contribuyó a evaluar la evolución de la distribución del tamaño de partícula a lo largo del tiempo (Figuras 3.7 y 3.8). A partir de este análisis, se puede observar la diferencia entre la distribución de tamaños de las AgNp sintetizadas en discontinuo y continuo. Además, la Figura 3.7 muestra imágenes TEM con el tamaño medio y la desviación estándar de partículas sintetizadas a 40°C con r: 5/1 y 70°C con r: 1/5 en discontinuo y continuo a  $t_1$ . Como se observa en las Figuras 3.7 y 3.8, la menor estándar de los tamaños de partícula se obtiene con el método continuo, lo que conduce a suspensiones de partículas con distribuciones de tamaño más estrecho [5, 12].



**Figura 3.7. Evaluación de la estabilidad coloidal de las AgNp.** Imágenes de TEM e histogramas de las distribuciones de tamaños de AgNp preparadas a 40°C con  $r=5/1$  (arriba) y 70°C con  $r=1/5$  (abajo) luego de 8 meses ( $t_1$ ) de almacenamiento. a y c: método discontinuo. b y d: método continuo.

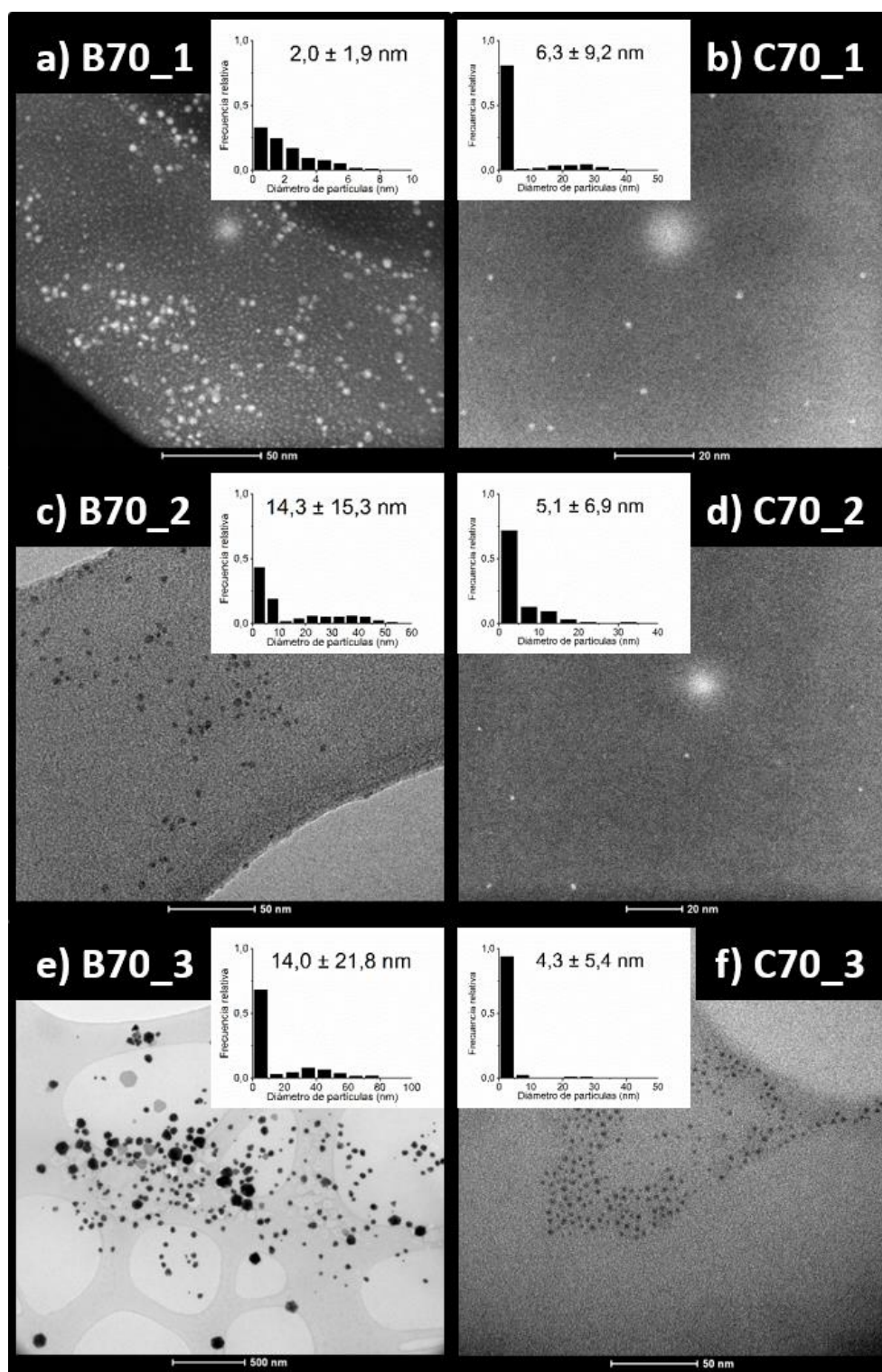


**Figura 3.8. Evaluación de la estabilidad coloidal de las AgNp.** Distribución de tamaños de las AgNp almacenadas durante 8 meses ( $t_1$ ) representada con diagrama de caja.

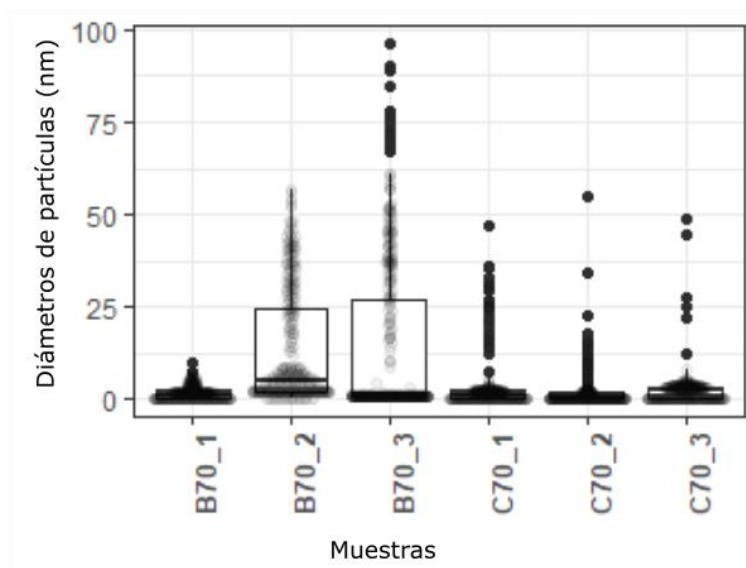
Finalmente, las suspensiones se estudiaron después de almacenarse durante 48 meses ( $t_3$ ) en condiciones ambientales sin protección contra la luz. Los resultados de UV-vis y TEM se muestran en las Figuras 3.6 y 3.9, respectivamente y se observa que la intensidad del espectro UV-vis disminuyó en todos los casos. Para obtener una mejor comparación, todos los espectros obtenidos en  $t_3$  se magnificaron 5 veces a excepción de la condición de síntesis 70°C y  $r = 1/5$ , en cuyo caso el factor fue 2. Estos resultados podrían indicar la disolución de AgNp en la suspensión y la aglomeración de las nanopartículas, fácilmente observables por inspección visual de las suspensiones. Estas evidencias concuerdan con que el ancho de los espectros de la síntesis discontinua resultaron mucho más amplios que en los experimentos análogos realizados con el microreactor. Cabe mencionar que el SPR en la mayoría de las condiciones de flujo continuo no se modificó, lo que indica que las AgNp restantes se mantienen estables en la suspensión y conservan su tamaño y morfología como lo demuestran las imágenes TEM (Figura 3.9). Sin embargo, los histogramas de tamaño de partícula muestran una nueva distribución que incluye diámetros medios mayores. A pesar de esta distribución final en  $t_3$ , todavía hay muchas partículas pequeñas con el mismo diámetro medido en  $t_0$  (Tabla 3.2).

El gráfico de diagrama de caja también se trazó con la distribución del tamaño de las AgNp de algunas suspensiones medidas después de 48 meses (Figura 3.10). Los resultados están de acuerdo con los espectros UV-vis presentados en la Figura 3.6. En todas las suspensiones, se formaron partículas con mayor tamaño, aunque todavía se manifiestan partículas de tamaño nanométrico. A partir de los resultados de UV-vis obtenidos luego de 48 meses, en los que la intensidad del espectro disminuyó drásticamente, podría sugerirse que durante este largo plazo ocurre un proceso de disolución de nanopartículas.





**Figura 3.9. Evaluación de la estabilidad coloidal de las AgNp.** Imágenes de TEM e histogramas de las distribuciones de tamaños de AgNp preparadas a 70°C con  $r=5/1$ ,  $1/1$  y  $1/5$  luego de 48 meses ( $t_3$ ) de almacenamiento. a, c y d: método discontinuo. b, d y f: método continuo.



**Figura 3.10. Evaluación de la estabilidad coloidal de las AgNp.** Distribución de tamaños de las AgNp almacenadas durante 48 meses ( $t_3$ ) representada con diagrama de caja.

### 3.4. Conclusiones parciales

Este estudio presenta un método novedoso y ambientalmente benigno para la síntesis de nanopartículas de plata coloidales esféricas con excelentes características en términos de reproducibilidad y estabilidad. Se siguió un protocolo de síntesis verde en el que se usaron almidón y glucosa como agente estabilizante y agente reductor, respectivamente. Se usaron sistemas discontinuos y continuos para comparar la reproducibilidad y la estabilidad a largo plazo de las suspensiones de AgNp resultantes. Se estudiaron los efectos de la temperatura de reacción y las relaciones de reactivo sobre las características del producto final para determinar las condiciones de síntesis óptimas. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la producción óptima de nanopartículas de plata se logra cuando la relación Ag/glucosa es  $r = 1/5$  y la temperatura es  $70^{\circ}\text{C}$ , tanto para sistemas discontinuos como continuos. Sin embargo, el sistema continuo arrojó los mejores resultados en términos de reproducibilidad y estabilidad en comparación con la síntesis en discontinuo bajo condiciones de reacción idénticas; pero tiempos de residencia de reacción mucho menores. De hecho, se obtuvo una distribución de tamaño de nanopartículas más estrecha con el microrreactor en comparación con la obtenida con el reactor discontinuo. Esto se debe a que la



microfluídica conduce a un mejor proceso de mezcla de los reactivos, que mejora la conversión y la transferencia de masa y calor.

El uso combinado de reactivos verdes, como la glucosa y almidón, condujo a la obtención de AgNp con gran estabilidad, principalmente cuando el proceso de síntesis se realizó en régimen continuo. La presencia de almidón resulta crucial para garantizar la estabilidad de AgNp en la suspensión. La principal contribución de este trabajo es el análisis del comportamiento (respuesta óptica, morfología y distribución del tamaño) de las suspensiones de AgNp obtenidas con ambas disposiciones y diferentes condiciones de reacción después de un almacenamiento a largo plazo (48 meses) sin protección de la luz. En todos los casos, la concentración de AgNp disminuyó después de cuatro años debido a la aglomeración de las partículas o a un posible efecto de disolución. Aunque para la mejor condición de síntesis observada (70°C,  $r = 1/5$ ), la pérdida de concentración de nanopartículas resultó inferior a la observada en las otras condiciones de síntesis.

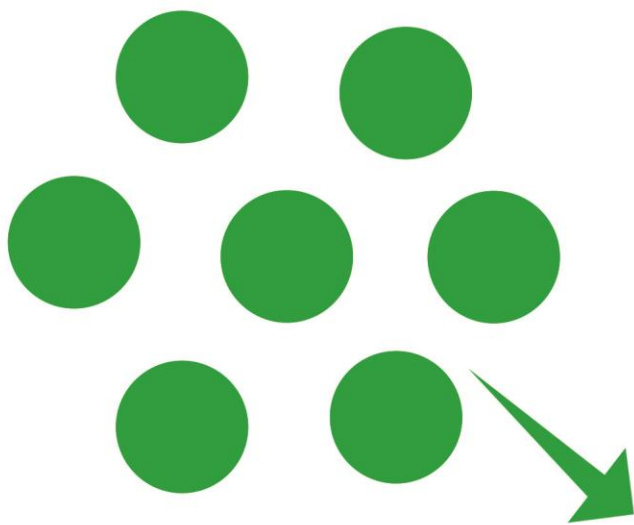
### 3.5. Bibliografía

1. Raveendran, P., Fu, J., Wallen, S.L., *Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, **2003**. 125 (46): p. 13940.
2. Jiang, X.C., Chen, W.M., Chen, C.Y., Xiong, S.X., Yu, A.B., *Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach*. Nanoscale Research Letters, **2011**. 6 (1): p. 32.
3. Bonatto, C.C., Silva, L.P., *Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells*. Industrial Crops and Products, **2014**. 58: p. 46.
4. Vigneshwaran, N., Nachane, R.P., Balasubramanya, R.H., Varadarajan, P.V., *A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch*. Carbohydrate Research, **2006**. 341 (12): p. 2012.
5. Gutierrez, L., Gomez, L., Irusta, S., Arruebo, M., Santamaria, J., *Comparative study of the synthesis of silica nanoparticles in micromixer–microreactor and batch reactor systems*. Chemical Engineering Journal, **2011**. 171 (2): p. 674.
6. Gomez, L., Arruebo, M., Sebastian, V., Gutierrez, L., Santamaria, J., *Facile synthesis of SiO<sub>2</sub>-Au nanoshells in a three-stage microfluidic system*. Journal of Materials Chemistry, **2012**. 22 (40): p. 21420.
7. Batabyal, S.K., Basu, C., Das, A.R., Sanyal, G.S., *Green chemical synthesis of silver nanowires and microfibers using starch*. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, **2007**. 1 (1): p. 143.
8. El-Rafie, M.H., Ahmed, H.B., Zahran, M.K., *Facile precursor for synthesis of silver nanoparticles using alkali treated maize starch*. International Scholarly Research Notices, **2014**. 2014: p. 12.
9. Ortiz de Solorzano, I., Uson, L., Larrea, A., Miana, M., Sebastian, V., Arruebo, M., *Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: effect of passive mixing*. International Journal of Nanomedicine, **2016**. 11: p. 3397.
10. Singh, M., Sinha, I., Mandal, R.K., *Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles*. Materials Letters, **2009**. 63 (3-4): p. 425.
11. Cheviron, P., Gouanvé, F., Espuche, E., *Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites*. Carbohydrate Polymers, **2014**. 108 (Supplement C): p. 291.
12. Patil, G.A., Bari, M.L., Bhanvase, B.A., Ganvir, V., Mishra, S., Sonawane, S.H., *Continuous synthesis of functional silver nanoparticles using microreactor: Effect of surfactant and process parameters*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, **2012**. 62: p. 69.

## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



### 4. NANOPARTÍCULAS DE COBRE



## Capítulo 4 : Nanopartículas de cobre

---

Este capítulo se basa en el análisis de cuatro protocolos de síntesis de nanopartículas de cobre (CuNp). En primer lugar, debido a que las CuNp resultan muy inestables, se presenta un análisis de la influencia de la oxidación de las CuNp sobre la posición y la forma del plasmón superficial de las nanopartículas con el objetivo de facilitar la interpretación y el análisis de los espectros de UV-vis a lo largo del capítulo. Luego, en función del agente reductor, se presenta cada protocolo por separado evaluando distintas modificaciones con el objetivo de realizar un estudio comparativo de las síntesis en discontinuo y continuo analizando diferentes variables.

### 4.1. Análisis de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) de las CuNp

Las nanopartículas metálicas tienen la propiedad de presentar un pico prominente en los espectros UV-vis que corresponde a una resonancia de plasmón superficial (SPR, del inglés surface plasmon resonance) debido a la oscilación coherente de los electrones en respuesta a la excitación por radiación electromagnética. Debido a la elevada relación de área superficial/volumen de los nanomateriales, la intensidad y la posición del SPR resulta altamente sensible al tamaño, forma y entorno químico de las nanopartículas. Las características del entorno local incluye las propiedades del solvente y matriz circundante y la adsorción y reacción de especies químicas en la superficie de las partículas [1]. Por este motivo, el SPR es ampliamente utilizado para la caracterización de nanopartículas de diferentes metales como oro, plata y cobre.

Para el caso de las partículas de cobre metálicas, CuNp, el SPR se encuentra alrededor de 570 nm [2-6]. Sin embargo, las CuNp son muy inestables y se oxidan fácilmente en condiciones ambientales, afectando la respuesta a la excitación UV.

La oxidación de las CuNp se produce debido al oxígeno disuelto, a las características del solvente y a la interacción con las moléculas de los agentes estabilizantes [7-9].

Pedersen y col. [7] obtuvieron CuNp con un diámetro de  $3,0 \pm 0,3$  nm generadas en vacío, utilizando una fuente de agregación por pulverización, y depositadas sobre vidrio. Estudiaron la oxidación de las partículas a diferentes temperaturas y las caracterizaron

mediante espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) para determinar los diferentes estados de oxidación y con espectroscopia de absorción UV-vis para evaluar las variaciones sobre el SPR. Previamente a ser expuestas al aire, las CuNp de 3 nm de diámetro presentaron un SPR en 570 nm (línea roja punteada, Figura 4.1). Luego, del primer contacto de las partículas con aire a temperatura ambiente el depósito de partículas adquirió color verde y observaron un corrimiento del SPR hacia mayores longitudes de onda (*red shift*), disminución de la intensidad y un aumento en el ancho del pico (línea verde punteada, Figura 4.1). A través de los estudios de composición, estos autores, propusieron que se forma una capa de óxido sobre la superficie de las CuNp, la cual llega a un espesor máximo a partir del cual ésta actúa como protectora de la oxidación progresiva de las nanopartículas. Luego, sometieron las CuNp a 160°C al aire para inducir mayor grado de oxidación y, observaron la desaparición del SPR centrado en 650 nm acompañado con el crecimiento de bandas de absorción en 230, 280 y 340 nm (línea continua amarilla, Figura 4.1) junto con un cambio de color de verde a amarillo, relacionándolo con la conversión de Cu a Cu<sub>2</sub>O. Finalmente, prolongaron la exposición de estas muestras a 220°C, la muestra adquirió un color marrón oscuro y las bandas asociados a Cu<sub>2</sub>O fueron reemplazadas por un pico más ancho centrado en 350 nm con una cola que extiende más allá de 800 nm (línea continua marrón, Figura 4.1), sugiriendo la presencia de CuO.

Por otro lado, Rice y col. [1] estudiaron la oxidación de CuNp en función del solvente, monitoreando los cambios a través de espectroscopia UV-vis y difracción de rayos X (DRX). La solución de CuNp obtenida mediante descomposición térmica presentó color rojo vino y una banda de absorción alrededor de 570 nm, indicando la formación de CuNp (línea punteada roja, Figura 4.1). A estas CuNp las resuspendieron en solventes orgánicos con y sin enlaces  $\pi$  (benceno y ciclohexano, respectivamente), en presencia de oxígeno disuelto. En un principio observaron un rápido incremento en la intensidad del SPR en las CuNp, pero a medida que el tiempo de oxidación aumentaba, la intensidad disminuía nuevamente junto con un ensanchamiento y un *red shift* del SPR (línea punteada verde, Figura 4.1). Hasta que finalmente esta banda se transformó en un amplio pico alrededor de 750 nm. En este punto el color de las suspensiones resultó verdeazulado claro, asociándolo a la presencia de nanopartículas de Cu<sub>2</sub>O. Estos autores

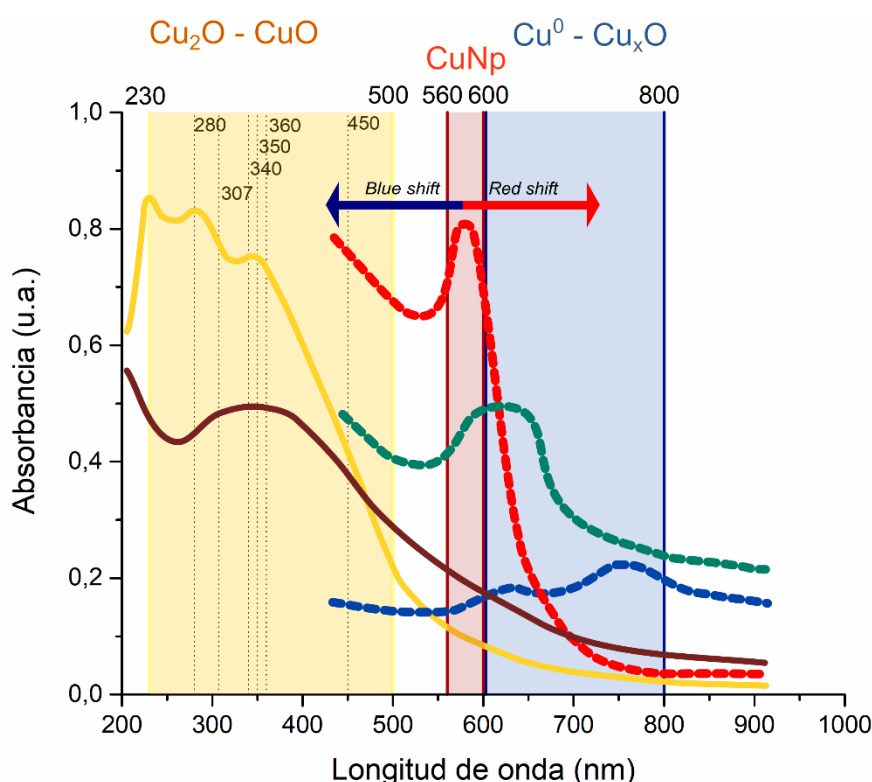
sugirieron que este aumento inicial en la intensidad del plasmón está relacionado con la presencia o ausencia de enlaces  $\pi$  en el solvente. Sin embargo la subsiguiente oxidación resultó independiente al solvente utilizado. En ambos casos se produjo el corrimiento del SPR a mayores longitudes de onda. Este corrimiento lo atribuyen a una combinación de factores: (i) el cambio en la constante dieléctrica del medio que rodea a los dominios de Cu. En un principio las CuNp se encuentran rodeadas por moléculas orgánicas y a medida que se oxidan se rodean por una capa de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , generando un aumento en la constante dieléctrica local, y dado que el SPR es sensible a esta propiedad, se produce su corrimiento a mayores longitudes. (ii) a la transferencia electrónica entre el dominio metálico y el dominio de óxido metálico de la superficie. Por último, la aparición y subsiguiente corrimiento del pico alrededor de 700 nm lo atribuyen a absorciones debidas al  $\text{Cu}_2\text{O}$ , indicando la formación y crecimiento de la capa de óxido alrededor de las partículas.

Shi y col. [9], por otro lado, estudiaron la formación de la capa de óxido sobre la superficie de las CuNp evaluando la influencia en la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS) en función de la presencia de diferentes ligandos en la superficie. Al igual que los anteriores, observaron una disminución de la intensidad y un corrimiento hacia mayores longitudes de onda, relacionándolo con la formación de una capa de óxido sobre la superficie de las CuNp (línea verde punteada, Figura 4.1). Además los espectros arrojaron un pico en 350 nm, el cual lo atribuyeron a la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (Figura 4.1).

Respecto al tamaño de las CuNp, se encuentra reportado que cuando el tamaño de las partículas disminuye, el plasmón se desplaza hacia menores longitudes (*blue shift*) [10, 11], en cambio en presencia de agregados se desplaza hacia mayores longitudes (*red shift*) con disminución del máximo de intensidad [12], hasta desaparecer por la precipitación de las partículas [8, 12], ya que las partículas grandes (>100 nm) no contribuyen a la formación del SPR [13]. Sin embargo, la ausencia de SPR también puede relacionarse con diámetros inferiores a 5 nm [1]. Las nanopartículas muy pequeñas y las agrupaciones atómicas pierden sus características ópticas en función del tamaño. Mientras que las CuNp más grandes y agregados de CuNp pequeñas muestran un pico de plasmón fuerte en ~570 nm, las CuNp menores a 5 nm no muestran picos de plasmón

fuertes. Se han observado picos u hombros muy pequeños; sin embargo, es común que las CuNp pequeñas carezcan de un claro pico en el rango visible [14].

De esta manera, al analizar los espectros UV-vis de las CuNp en el rango de 200 a 1000 nm es posible encontrar diferentes especies. En la figura 4.1 se muestra un esquema general de los tipos de espectros para CuNp reportados en la bibliografía consultada. Cada caso dependerá del método de síntesis, el tipo de solvente y agentes protectores, y de todos los parámetros que influyen en el tamaño, forma y estabilidad de las CuNp.



**Figura 4.1. Esquema generalizado de los posibles espectros UV-vis para las CuNp.** Región amarilla (230-500 nm): absorción de  $\text{Cu}_2\text{O} - \text{CuO}$ . Región roja (560-600 nm): absorción CuNp (partículas  $\text{Cu}^0$  nanométricas). Región azul (600-800 nm): absorción relacionada a la presencia de capa de óxido sobre la superficie de las CuNp ( $\text{Cu}^0 - \text{Cu}_x\text{O}$ ).

Con este análisis podría establecerse una lectura de los espectros que posibilitará el análisis de los resultados en cada caso. Cuando las partículas presentan un tamaño entre 5 y 100 nm la presencia de CuNp metálicas se comprueba por la presencia del SPR entre 560 y 600 nm. Debido a la facilidad de las CuNp a oxidarse el SPR se verá modificado de diferentes maneras. Si bien en la bibliografía se encontraron diferentes tipos de



espectros, se pueden resumir el comportamiento de las CuNp de la siguiente manera (Figura 4.1):

- Región amarilla (230-500 nm): bandas por debajo de 500 nm corresponderían a la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$  o  $\text{CuO}$ . En la Figura 4.1 las líneas de puntos verticales indican las diferentes posiciones de los máximos de intensidad relacionados a la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . [3, 7, 9, 15-18] o  $\text{CuO}$  [7].
- Región roja (560-600 nm): picos de absorbancia entre 560 y 600 nm corresponderían al SPR de las CuNp (partículas de  $\text{Cu}^0$  nanométricos) [2-6].
- Región azul (600-800 nm): disminución de la intensidad del SPR y desplazamiento hacia mayores longitudes de onda (*red shift*), 600 y 800 nm, se asocian a la formación de una capa de óxido sobre la superficie de las partículas ( $\text{Cu}^0 - \text{Cu}_x\text{O}$ ) [1, 7, 9, 19, 20] y al aumento del diámetro y/o formación de agregados [8, 10-12].

## 4.2. Reductor $\text{NaH}_2\text{PO}_2$

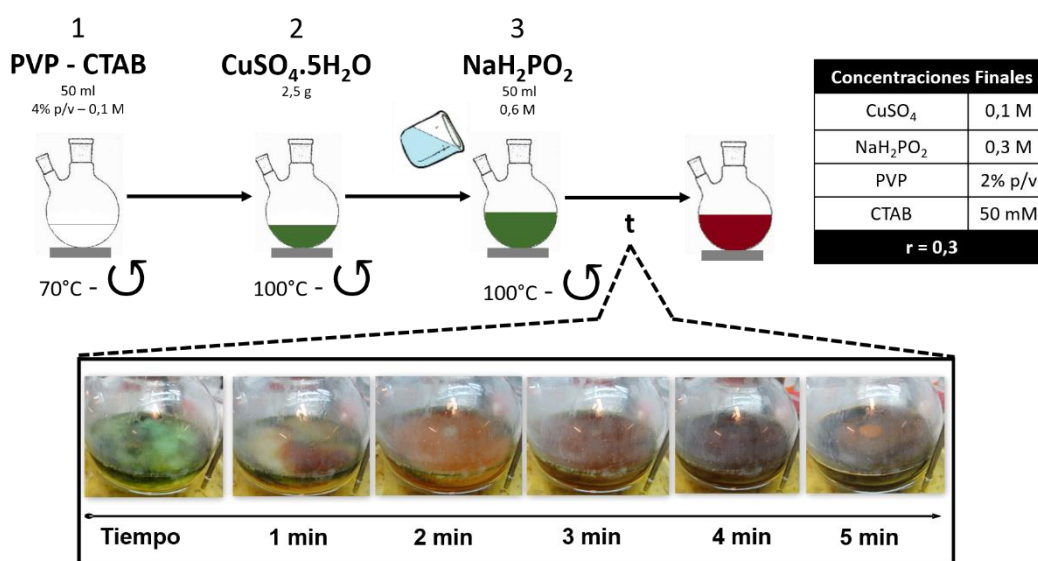
En esta sección se trata la síntesis de CuNp empleando  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  como agente reductor y una mezcla de polivinilpirrolidona/bromuro de cetiltrimetilamonio (PVP/CTAB) como estabilizante. A partir de un protocolo de referencia, se realizaron adaptaciones para llevar a cabo un estudio comparativo de la síntesis en sistema discontinuo y continuo de la influencia de la temperatura, el tiempo de residencia y la concentración de CTAB en la calidad de las nanopartículas obtenidas.

### 4.2.1. Síntesis en sistema discontinuo

El trabajo de Tang y col. [21] se tomó como referencia para la síntesis de CuNp. Estos autores sintetizaron las nanopartículas en un solvente orgánico, dietilenglicol (DEG). Emplearon  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como precursor,  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  como reductor y PVP/CTAB como estabilizantes.

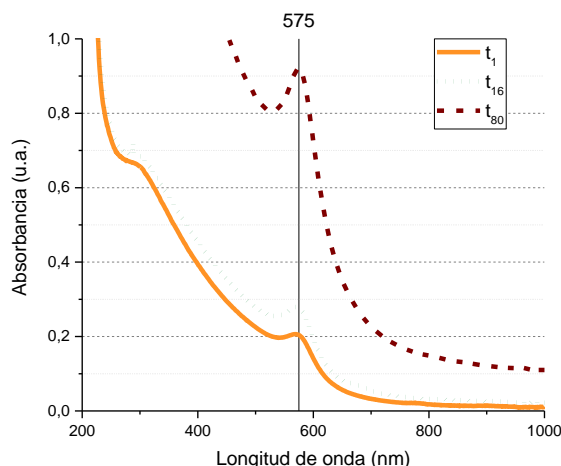
De esta manera se preparó 50 ml de una solución (1 en Figura 4.2) con una composición de 4% p/v de PVP, 0,1 M de CTAB en DEG, manteniendo en agitación a 70°C. Luego se incorporaron 2,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2 en Figura 4.2) y con agitación a 100°C (temperatura de reacción). Por otro lado, se preparó 50 ml de una solución 0,6 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  en DEG

(3 en Figura 4.2). Finalmente, se añadió la solución 3 a la 2, resultando las siguientes concentraciones finales: 0,1 M de  $\text{CuSO}_4$ , 0,3 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , 2% p/v de PVP y 50 mM de CTAB. En la Figura 4.2 se muestra la evolución de color una vez añadido el reductor. Luego de 5 min de reacción la disolución viró de color verde a rojo vino, siendo este color el característico de las suspensiones de CuNp con tamaño promedio superior a 4 nm [1, 3, 21].



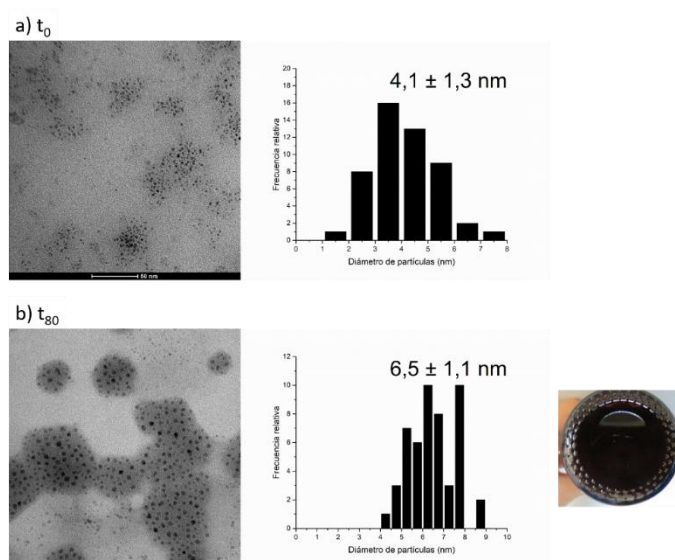
**Figura 4.2. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Protocolo de referencia [21]. Fotografías digitales de la evolución del color en el tiempo y la tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.**

En la Figura 4.3 se muestran los espectros UV-vis que resultaron de las muestras obtenidas siguiendo el protocolo de referencia. Se observa una banda de absorberancia en 575 nm, característico de las CuNp [2-4]. Esta señal se mantuvo estable hasta 80 días después de  $t_0$  (día de la síntesis) sin la formación de precipitados. Por lo tanto, se puede deducir que en este periodo las partículas sintetizadas conservaron su tamaño nanométrico sin formar agregados (Figura 4.4). Sin embargo, luego de 80 días ( $t_{80}$ ) se observó una absorción residual en 800 nm. En la bibliografía se reporta que este tipo de espectros con una señal centrada alrededor de 570 nm y una absorberancia residual en 800 nm, corresponde a CuNp metálicas cubiertas por una capa de óxido [1, 7, 9, 19, 20].



**Figura 4.3.** Estabilidad en el tiempo de las CuNp sintetizadas según el protocolo de referencia. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Espectros UV-vis de la suspensión de CuNp en diferentes períodos de almacenamiento 1 día, 16 días y 80 días ( $t_1$ ,  $t_{16}$  y  $t_{80}$ , respectivamente).

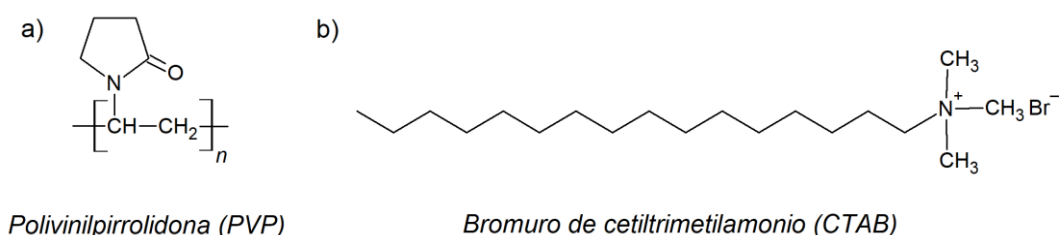
El diámetro de las partículas obtenidas por Tang y col. [21] resultó 25 nm y este valor se mantuvo estable hasta los 30 días sin aparición de precipitado. Mientras que en nuestro laboratorio el tamaño de partículas fue  $4,1 \pm 1,3$  nm a  $t_1$  (Figura 4.4-a) y  $6,5 \pm 1,1$  nm a  $t_{80}$  (Figura 4.4-b), dato que también refleja la estabilidad de las CuNp.



**Figura 4.4.** Estabilidad en el tiempo de CuNp sintetizadas según el protocolo de referencia. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de partículas: a) día de la síntesis ( $t_0$ ) y b) luego de los 80 días ( $t_{80}$ ). La fotografía digital muestra el aspecto de la suspensión a  $t_{80}$ .

El tamaño, la morfología y la distribución de tamaños de las partículas se ven influenciados por todas aquellas condiciones que afecten el proceso de mezclado, como la velocidad de adición de reactivo y la velocidad de agitación. La relación de reactivos, la temperatura y el tiempo de reacción son variables fácilmente reproducibles; pero no puede garantizarse que el control de la velocidad de agitación haya sido concordante con el método de referencia. Por lo tanto, las diferencias observadas en la calidad final del material podrían deberse a este parámetro [22].

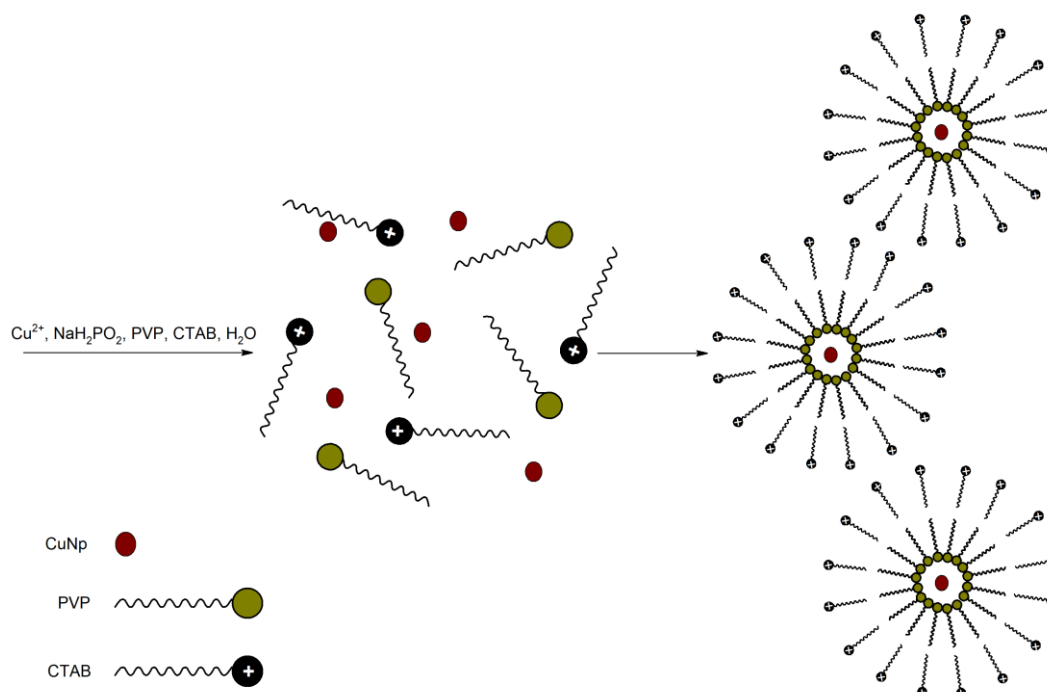
La calidad de los reactivos y de los agentes estabilizantes influye también, sobre las características finales de las partículas sintetizadas, como también el tratamiento post-síntesis de las suspensiones resultantes. En el protocolo de referencia, autores indican que las nanopartículas fueron purificadas mediante electrodiálisis eliminando impurezas iónicas tales como los iones  $\text{Br}^-$  asociados al CTAB. Este tratamiento podría, a su vez ser la causa de la diferencia entre el tamaño y la estabilidad de las partículas.



**Figura 4.5 Agentes estabilizantes.** a) Polivinilpirrolidona (PVP) y b) bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

En efecto, el PVP es un polímero formado por cadenas de múltiples vinilpirrolidonas (Figura 4.5-a), mientras que el CTAB es una sal de amonio cuaternaria con un grupo metilo de gran longitud (Figura 4.5-b). El PVP interactúa con los iones  $\text{Cu}^{2+}$  mediante los pares de electrones no compartidos de los átomos de nitrógeno y oxígeno. De esta manera disminuye el potencial de reducción  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^0$  y el proceso de reducción resulta más estable. Una vez formadas las CuNp el PVP ejerce un efecto estérico, restringiendo el crecimiento de las partículas e inhibiendo la aglomeración (Figura 4.6) [21]. En cambio el CTAB, como agente tensoactivo catiónico, coordina fácilmente a través del nitrógeno. De esta forma, la repulsión entre las CuNp aumenta tras absorber los iones positivos del

CTAB, formando una estructura doble capa que separa mediante fuerzas electrostáticas y efecto estérico (Figura 4.6) [21].



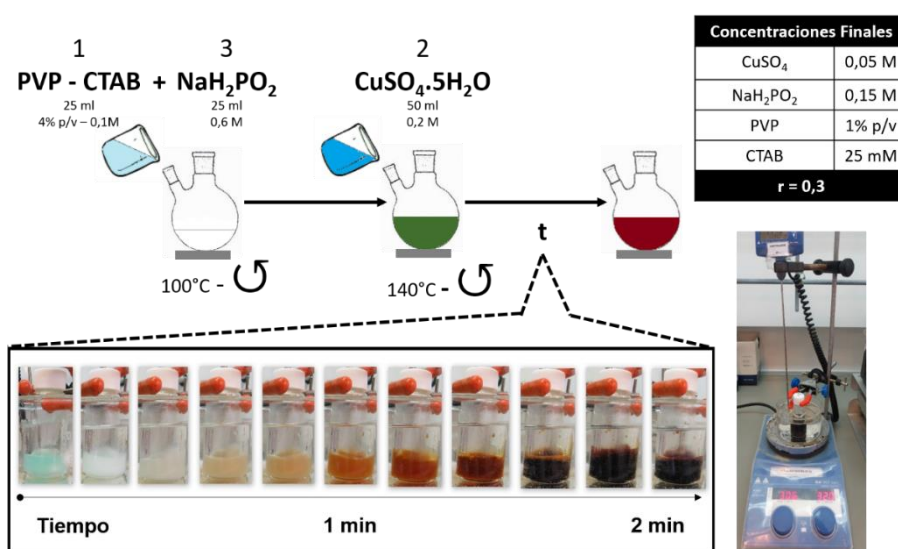
**Figura 4.6. Agentes estabilizantes.** Mecanismo de estabilización de las CuNp en presencia de PVP y CTAB. Esquema adaptado de Tang y col. [21]

Teniendo en cuenta estas características, el tratamiento de la suspensión mediante electrodiálisis genera una disminución de la fuerza iónica del medio que rodea a las partículas por la pérdida de iones de  $\text{Br}^-$  del CTAB. Este efecto podría afectar la estabilidad de las interacciones electrostáticas entre las CuNp y las moléculas de CTAB y PVP que mantienen las partículas en suspensión [10, 13]. Por lo tanto, la disminución de la fuerza iónica podría explicar no sólo el mayor tamaño de las partículas sino también la menor estabilidad de las CuNp obtenidas por los mencionados autores.

#### 4.2.1.1. Modificaciones a partir del protocolo de referencia

Habiendo logrado partículas estables en forma discontinua, se plantea reproducir el protocolo en sistema continuo. Para ello debieron ajustarse algunas condiciones para hacer viable la síntesis en flujo.

En el protocolo original, el precursor se agrega en forma sólida, mientras que para el sistema continuo es necesario hacerlo en solución. Por lo esto y para facilitar su disolución en DEG, el  $\text{CuSO}_4$  se disolvió previamente en DEG preparando una solución de 50 ml 0,1M (2 en la Figura 4.7). Por otro lado se prepararon 25 ml de una solución de PVP y CTAB y 25 ml de una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  (1 y 3, respectivamente, en la Figura 4.7), respetando las relaciones molares del protocolo original. Se mezclaron 25 ml de las soluciones 1 y 3 a  $100^\circ\text{C}$  y luego se incorporaron 50 ml de la solución 2. En este caso las concentraciones finales resultaron: 0,05 M de  $\text{CuSO}_4$ , 0,15 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , 1% p/v de PVP y 25 mM de CTAB.



**Figura 4.7. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ .** Adaptación del protocolo de referencia [21]. Fotografías digitales del sistema utilizado y de la evolución del color en el tiempo. La tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.

A raíz de la necesidad de disolver el precursor, las concentraciones finales resultaron 50% más diluidas que las del protocolo original. Con estas soluciones madres se estudiaron diferentes condiciones de reacción para evaluar la influencia de estos cambios en la calidad y la estabilidad de las CuNp obtenidas.

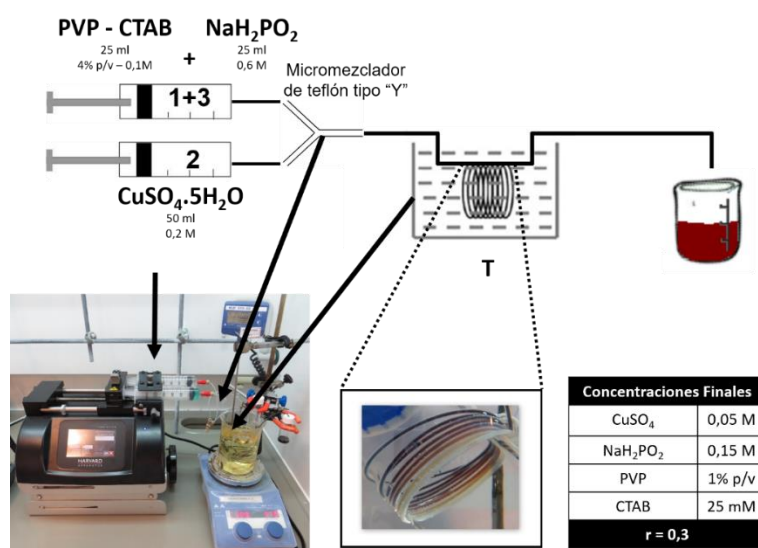
- Temperatura de reacción: 100 - 120 y  $140^\circ\text{C}$ .
- Tiempos de residencia: 2 - 5 - 10 y 15 min.

- **Concentración de CTAB.** Debido a que el CTAB es un surfactante con actividad antimicrobiana [23], se estudiaron diferentes concentraciones finales de CTAB (25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 y 0,5 mM) tendiendo a obtener nanopartículas con la menor cantidad de surfactante posible para que no interfiera en la evaluación de la actividad bactericida de las CuNp.

Los resultados se presentan, a continuación, comparativamente con las síntesis realizadas en sistema continuo.

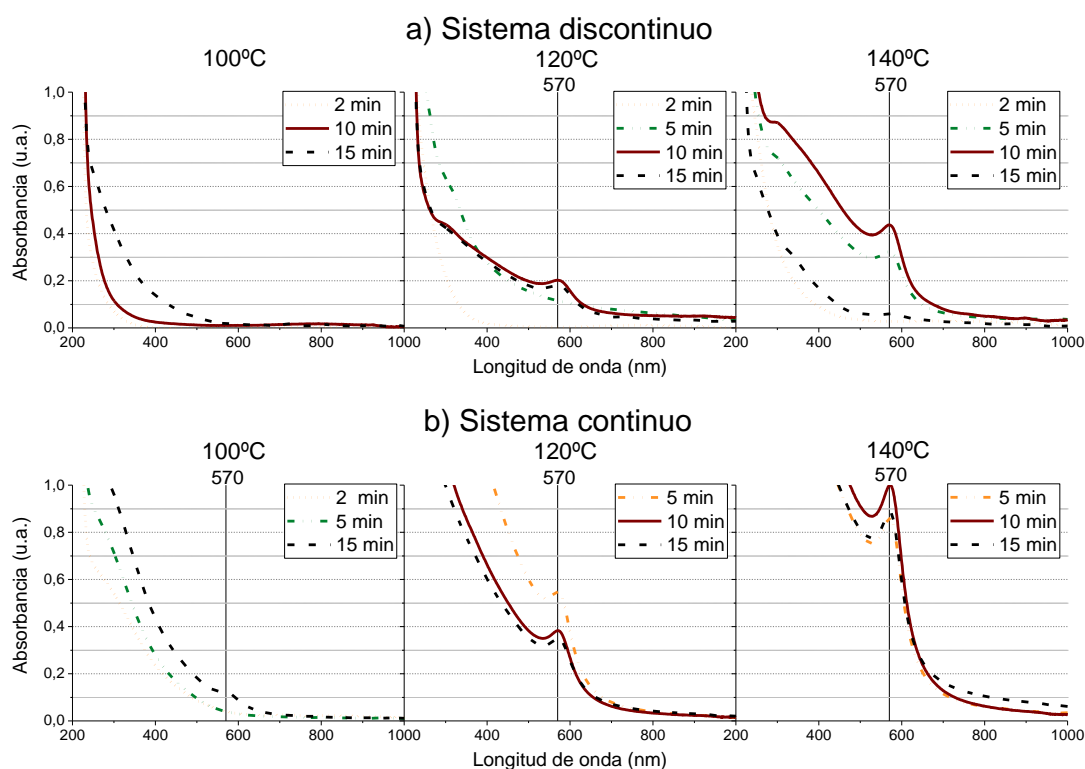
#### 4.2.2. Síntesis en sistema continuo

En la Figura 4.8 se muestra un esquema del sistema continuo (micromezclador de teflón tipo “Y”) empleado para las síntesis de CuNp con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  como agente reductor. Se mezclaron volúmenes iguales de la solución 1 y 3 (conteniendo la solución de estabilizantes y el reductor, respectivamente) en una jeringa y en la segunda se colocó la solución 2 (conteniendo el precursor de Cu). El cambio de color se observó en el interior de la tubería de reacción, indicando la formación de CuNp (Figura 4.8). Bajo esta configuración se desarrollaron los experimentos para estudiar las diferentes variables de síntesis.



**Figura 4.8. Síntesis de CuNp en sistema continuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Sistema continuo con micromezclador de teflón tipo “Y”. Fotografías digitales del sistema de bomba de jeringa utilizado y de la evolución del color en la tubería. La tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.**

En la Figura 4.9 se muestran los espectros UV-vis de las suspensiones obtenidas con los diferentes parámetros de reacción (temperatura y tiempos de residencia) con ambas disposiciones. Por ambos métodos se observa que con el aumento de la temperatura (i) aumenta la señal a 570 nm y, (ii) disminuye el tiempo de residencia; además, (iii) a una misma temperatura el tiempo de residencia requerido en el sistema discontinuo resultó mayor que en el continuo. Esto último se refleja en la diferencia de intensidades de los espectros. Tang y col. [21] también observaron una fuerte influencia de la temperatura sobre el tiempo de reacción ya que a medida de que esta aumenta, el cambio de color se produce más rápido. Sin embargo, en nuestro caso observamos que a medida que la temperatura aumenta, el máximo de intensidad del SPR se alcanza en menor tiempo. Estos resultados coinciden con los resultados observados en la síntesis de AgNp [24], es decir que tanto la temperatura de reacción como la configuración del dispositivo de reacción influyen sobre el SPR de las nanopartículas (Capítulo 3.2).

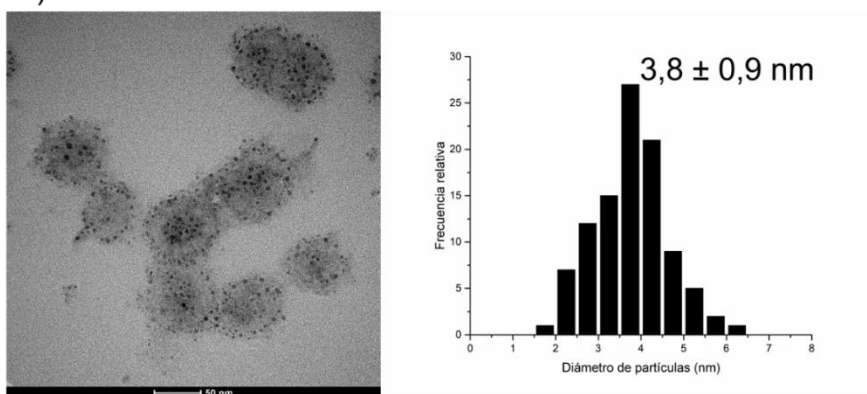


**Figura 4.9. Síntesis de CuNp en sistemas a) discontinuo y b) continuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Influencia de la temperatura y tiempo de residencia. Espectros UV-vis de CuNp sintetizadas a diferentes temperaturas (100, 120 y 140°C) y tiempos de residencia (2, 5, 10 y 15 min).**

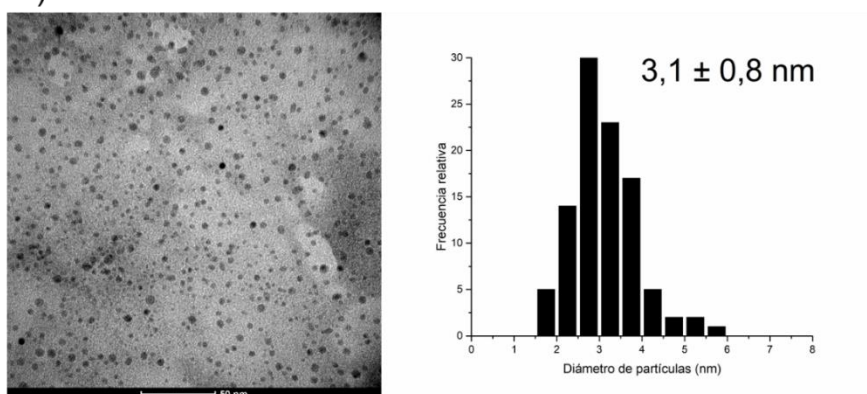


En la Figura 4.10 se muestran las micrografías de TEM de suspensiones de CuNp obtenidas con ambos sistemas a 140°C y 10 min de tiempo de residencia. Para el sistema discontinuo se obtuvo una suspensión de partículas con un tamaño promedio de  $3,8 \pm 0,9$  nm y para el continuo de  $3,1 \pm 0,8$  nm. Esto estaría indicando que la configuración utilizada para la síntesis no influiría sobre el tamaño de partículas ni sobre la distribución de tamaños. Sin embargo, se observa mayor intensidad de la señal de SPR en las suspensiones obtenidas en continuo (Figura 4.9), que sugiere mayor concentración de CuNp [25, 26]. Esto podría deberse a la fluidodinámica del sistema continuo que da lugar a un mezclado más homogéneo y por lo tanto a una reacción en menos tiempo [27-29].

a) Sistema discontinuo



b) Sistema continuo

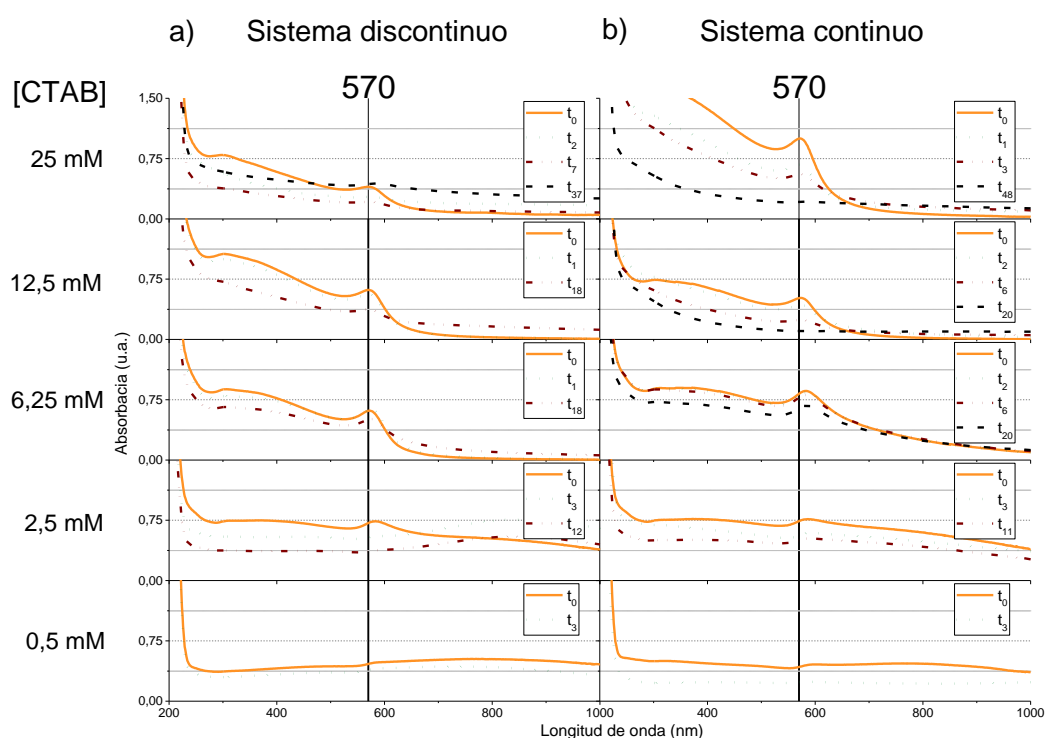


**Figura 4.10. Síntesis de CuNp en sistemas a) discontinuo y b) continuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . Temperatura: 140°C. Tiempo de residencia: 10 min. Comparación de tamaños de CuNp. Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de partículas.**

A partir de las evidencias experimentales obtenidas se establecieron como temperaturas de reacción 140°C y 10 min de tiempo de residencia y se continuó con el

estudio del efecto de la concentración del surfactante CTAB (25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 y 0,5 mM).

La Figura 4.11 muestra los espectros UV-vis de las suspensiones de CuNp obtenidas con las diferentes configuraciones. En ambos sistemas, el SPR se mantuvo aproximadamente en 570 nm con concentraciones de surfactante entre 25 y 6,25 mM. Contenidos de CTAB menores a 2,5 mM conducen a una disminución de la intensidad del SPR y la aparición de una absorbancia residual a 800 nm, acentuándose cuando la concentración de CTAB es 0,5 mM. Lo que indicaría que cuando la concentración de surfactante disminuye se favorece la formación de óxido de Cu sobre la superficie de las CuNp [19]. Esto sugiere que el CTAB actúa como estabilizante protegiendo a las partículas de la oxidación. A su vez una concentración de 6,25 mM representa una óptima [CTAB] otorgando estabilidad en el tiempo a las CuNp y protegiéndolas de su desaparición.

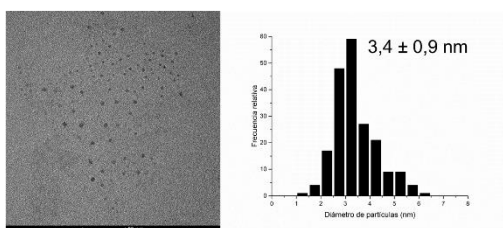


**Figura 4.11. Síntesis de CuNp en sistemas a) discontinuo y b) continuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . T:  $140^\circ\text{C}$ . Tiempo de residencia: 10 min. Influencia de la concentración de CTAB ([CTAB]: 25 – 12,5 – 6,25 – 2,5 y 0,5 mM) sobre el SPR y la estabilidad de las CuNp a distintos tiempos ( $t_0$ : día de síntesis,  $t_n$ : n días de almacenamiento de la suspensión).**

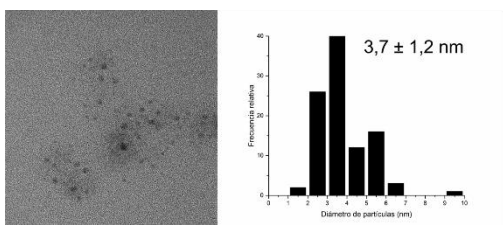
Por otro lado, las micrografías de TEM de CuNp muestran que cuando la concentración de CTAB disminuye de 25 a 6,25 mM (Figura 4.12) tanto el tamaño de partículas como la distribución de tamaños no se vieron significativamente afectados. Mientras que en las micrografías de las suspensiones con 2,5 y 0,5 mM no se detectaron nanopartículas suspendidas debido a que resultaron inestables con presencia de precipitado. Se ha reportado que la disminución de la concentración de CTAB genera un aumento del tamaño de CuNp en suspensión [5, 30], lo cual coincide con la presencia de precipitado en las muestras con 2,5 y 0,5 mM. Por otro lado, se reportó que para obtener una variación mínima en el tamaño de partículas es necesario que la concentración de CTAB se encuentre en exceso respecto a los iones de Cu [30].

#### a) Sistema discontinuo

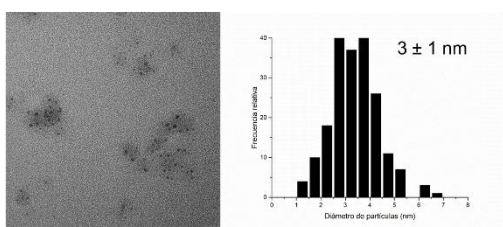
[CTAB]: 25 mM



[CTAB]: 12,5 mM

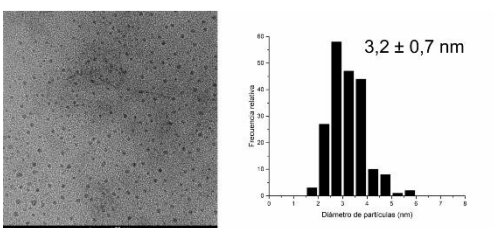


[CTAB]: 6,25 mM

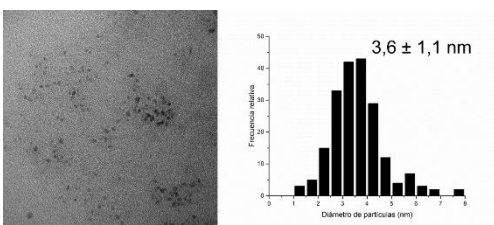


#### b) Sistema continuo

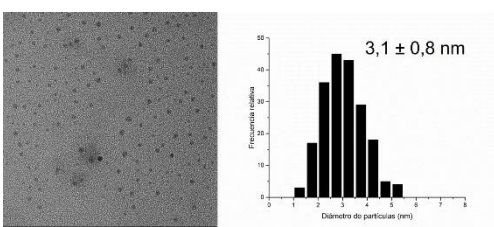
[CTAB]: 25 mM



[CTAB]: 12,5 mM



[CTAB]: 6,25 mM

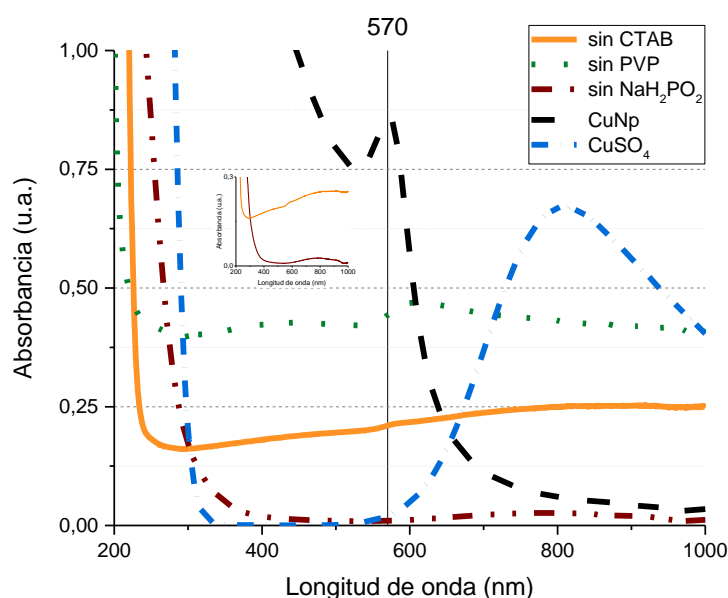


**Figura 4.12. Síntesis de CuNp en sistemas a) discontinuo y b) continuo. Reductor:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ . Precursor:  $\text{CuSO}_4$ . T:  $140^\circ\text{C}$ . Tiempo de residencia: 10 min. Influencia de la concentración de CTAB ([CTAB]: 25 – 12,5 – y 6,25 mM) sobre el tamaño y distribución de tamaños de las CuNp. Micrografías TEM e histogramas de distribución de tamaño partículas.**

Tang y col. [21] estudiaron el efecto de la concentración de CTAB sobre el tamaño de las CuNp en presencia de PVP. Compararon partículas obtenidas con relaciones molares Cu/CTAB de 1, 2, 4 y 8 y observaron que cuando la relación es de 1 y 2 el tamaño promedio se mantiene alrededor de 20 nm y aumentaba a 30 y 80 nm con las relaciones 4 y 8, respectivamente. El hecho de que al variar la relación entre 1 y 2 el tamaño de partículas se mantiene alrededor de 20 nm muestra que es necesario un exceso en la concentración de CTAB para el tamaño de partículas no se vea afectado.

Sin embargo, en nuestro caso no resultó necesario un exceso en la concentración de CTAB respecto al Cu, ya que relaciones molares 2, 4 y 8 dieron lugar a partículas de 3 a 4 nm sin diferencias significativas (Figura 4.12, concentraciones de CTAB 25 - 12,5 y 6,25, respectivamente).

Con el objetivo de estudiar el efecto de los reactivos involucrados en la síntesis, se comparó el espectro de absorbancia de una suspensión de CuNp (en presencia de CTAB, PVP y  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ) con suspensiones preparadas sin CTAB, sin PVP y sin  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  (Figura 4.13). Además, se evaluó el espectro de una solución de  $\text{CuSO}_4$  en ausencia de todos los reactivos como referencia de absorbancia de  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 4.13. Efecto de la presencia de los diferentes reactivos sobre el SPR de las CuNp.** Espectros UV-vis de la suspensión de CuNp con diferentes combinaciones de reactivos

A partir del análisis de la Figura 4.13 se infiere que tanto el CTAB como el PVP ejercen funciones como estabilizantes manteniendo las partículas en suspensión y protectores de la oxidación, ya que en ausencia de cualquiera de ellos tuvo lugar un incremento de la absorbancia residual en 800 nm. Esto coincide con lo observado al disminuir la concentración de CTAB a concentraciones menores que 2.5 mM (Figura 4.11).

Con estos resultados es posible decir que la combinación de ambas moléculas estabilizantes permite disminuir la concentración del surfactante (CTAB) sin modificar significativamente el tamaño de partículas y logrando suspensiones estables hasta 20 días (Figura 4.11).

### 4.2.3. Conclusiones parciales

Se propuso la síntesis de CuNp en medio orgánico con  $\text{CuSO}_4$  como sal precursora,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como agente reductor y CTAB y PVP como estabilizantes. Con el objetivo de realizar un estudio comparativo entre los sistemas, discontinuo y continuo, se estudiaron el tiempo de residencia, la temperatura de reacción y la  $[\text{CTAB}]$ .

Se concluyó que la temperatura y el tipo de configuración conllevan a una disminución del tiempo de residencia. A su vez, el sistema continuo da lugar a una mayor concentración de partículas.

Además se comprobó que el CTAB y el PVP ejercen funciones estabilizantes protegiendo las partículas de la oxidación superficial y la agregación. La fuerza iónica del medio es un factor importante dado que las partículas se estabilizan tanto por efectos estéricos como electrostáticos.

Finalmente, fue posible obtener CuNp de mediante ambos sistemas, discontinuo y continuo. Sin embargo, el CTAB se utiliza como agente surfactante habitual en la síntesis de nanopartículas, pero presenta una gran desventaja asociada a su elevada citotoxicidad [31-33]. Por este motivo, se plantearon protocolos que empleen otro tipo de agente protector.

## 4.3. Reductor $\text{N}_2\text{H}_4$

Esta sección está centrada en la síntesis de CuNp empleando  $\text{N}_2\text{H}_4$  como reductor y PVP como agente estabilizante. En este caso se consideró necesario establecer primero en

sistema discontinuo el tipo de sal precursora, concentración de PVP y tiempo de residencia. Luego se optimizó el sistema continuo de flujo segmentado para finalmente evaluar las condiciones seleccionadas, previamente en la configuración discontinua. Por este motivo ambas configuraciones se presentan por separado.

### 4.3.1. Síntesis en sistema discontinuo

Singh y col. proponen  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  como sal precursora,  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  como reductor y estudian comparativamente el efecto estabilizante del almidón, PVP y PVA (polivinil alcohol) [34]. Los autores obtuvieron, en los tres casos, distribuciones de tamaño bimodal, con una población de partículas menores a 5 nm y otra con tamaños entre 10 y 20 nm. Además, en las muestras estabilizadas con PVP y PVA, la frecuencia máxima de las distribuciones de tamaño de partículas más grandes dominaba sobre las más pequeñas. Mientras que, en las muestras estabilizadas con almidón, el resultado fue opuesto. Las evidencias experimentales reportadas sugieren también que, en las condiciones de síntesis el almidón sólo actúa como estabilizante mientras que el PVP no sólo tendría efecto estabilizante sino que también cierto carácter reductor facilitando la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$ .

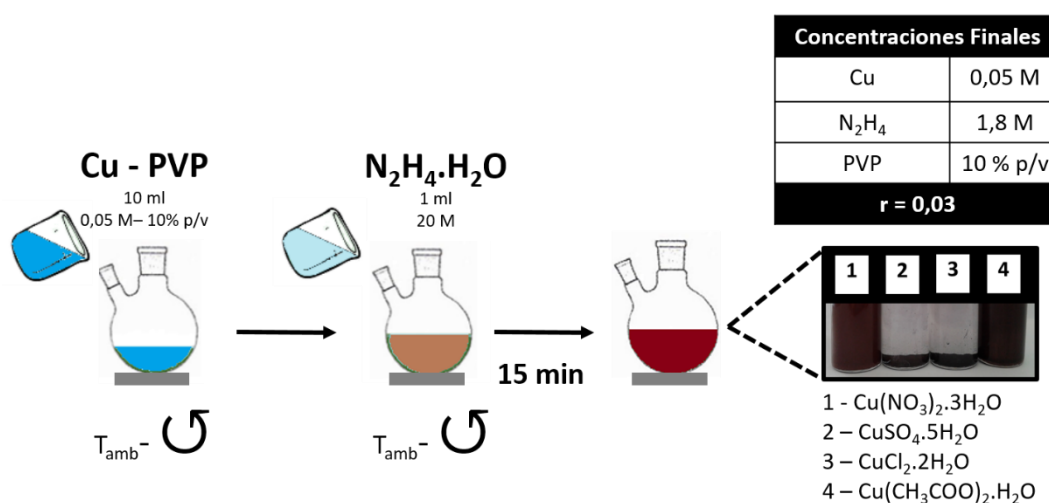
Por otro lado, distintos trabajos presentan la influencia del tipo de precursor sobre las características de las partículas obtenidas. Se ha visto que la naturaleza y concentración de los precursores influyen en el mecanismo de formación de las nanopartículas, lo que a su vez afecta en el tamaño y la forma [20, 35-37]. Los diferentes aniones de las sales  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  presentan distintas formas y polaridades, generando distintas interacciones entre las moléculas reaccionantes y no reaccionantes del medio de reacción y afectando significativamente la difusión y adsorción del complejo precursor. Finalmente, estos diferentes efectos influyen sobre la morfología y propiedades de las nanopartículas [37].

#### 4.3.1.1. Evaluación de diferentes precursores

A raíz de lo expuesto anteriormente, se planteó reproducir el protocolo de Singh y col. [34] empleando PVP como estabilizante y analizar el uso de diferentes precursores, como  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . De esta manera se agregó 1 ml de  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  20 M a 10 ml de una solución 0,05 M de Cu y 10% p/v de PVP

manteniendo agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos (Figura 4.14). El radio hidrodinámico de las partículas en suspensión se midió por DLS y el SPR mediante espectroscopia UV-vis. Para optimizar las medidas, las suspensiones se centrifugaron para eliminar grandes agregados y los sobrenadantes se diluyeron 1/5.

La fotografía de la Figura 4.14 refleja que luego de un día de almacenamiento, con  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{CuCl}_2$  la suspensión precipita completamente, mientras que con los precursores  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  se logran partículas coloidales estables.



**Figura 4.14. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $\text{N}_2\text{H}_4$ . Esquema adaptado al protocolo de referencia. Fotografía digital luego de un día de almacenamiento y la tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.**

Observaciones similares fueron reportadas por Pacioni y col. [20], quienes compararon la síntesis fotoquímica de CuNp a partir de  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Estos autores distinguieron diferencias en la velocidad de formación de las nanopartículas dependiendo del precursor empleado, resultando  $\text{CuCl}_2 \gg \text{CuSO}_4 > \text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . También sugirieron que los iones  $\text{Cl}^-$  actuarían catalizando la reacción redox de  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ , de manera que el proceso de crecimiento de partículas se produciría inmediatamente después de la nucleación dando lugar a una suspensión de nanopartículas con una alta dispersión de tamaño. En efecto, utilizando  $\text{CuSO}_4$  obtuvieron partículas con un tamaño promedio de  $8,2 \pm 3,1$  nm, mientras que con  $\text{CuCl}_2$  el tamaño resultó  $18 \pm 17,6$  nm. En conclusión, el uso de  $\text{CuCl}_2$  conduce a nanopartículas de muy elevada dispersión de tamaño, incluyendo partículas de hasta 100 nm. Esto concuerda con la teoría de LaMer,



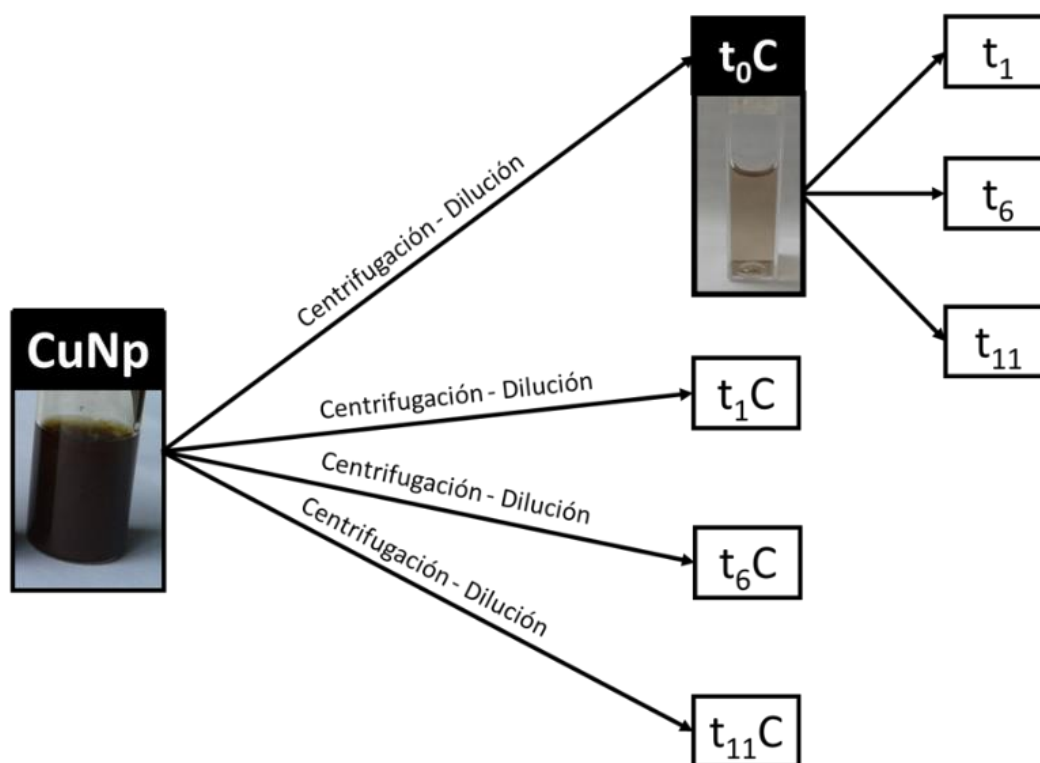
la cual indica que para obtener un sistema de partículas monodisperso los procesos nucleación y el crecimiento deben ocurrir de manera consecutiva y no superponerse en el tiempo [38].

Este análisis podría explicar las diferencias obtenidas en nuestro laboratorio, luego de evaluar los diferentes precursores. Si bien las condiciones de síntesis no son totalmente comparables con las reportadas por Pacioni y col. [20], estos resultados sugieren que el tipo de precursor estaría directamente relacionado con la nucleación y crecimiento de nanopartículas. De esta manera se podría concluir que las velocidades formación de CuNp con  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{CuCl}_2$  resultaron más rápidas de manera que se formaron partículas con mayor tamaño y dispersión, generando el precipitado observado (Figura 4.14) [38]. Por el contrario, al utilizar  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  la reacción resultó más lenta dando lugar a partículas con baja dispersión de tamaño y diámetro hidrodinámico de  $126,2 \pm 0,9$  y  $182,7 \pm 1,56$  nm, respectivamente ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 - t_0\text{C}$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 - t_0\text{C}$  de la Tabla 4.1); y por lo tanto más estables.

### 4.3.1.2. Efecto del tamaño de partículas sobre la estabilidad coloidal

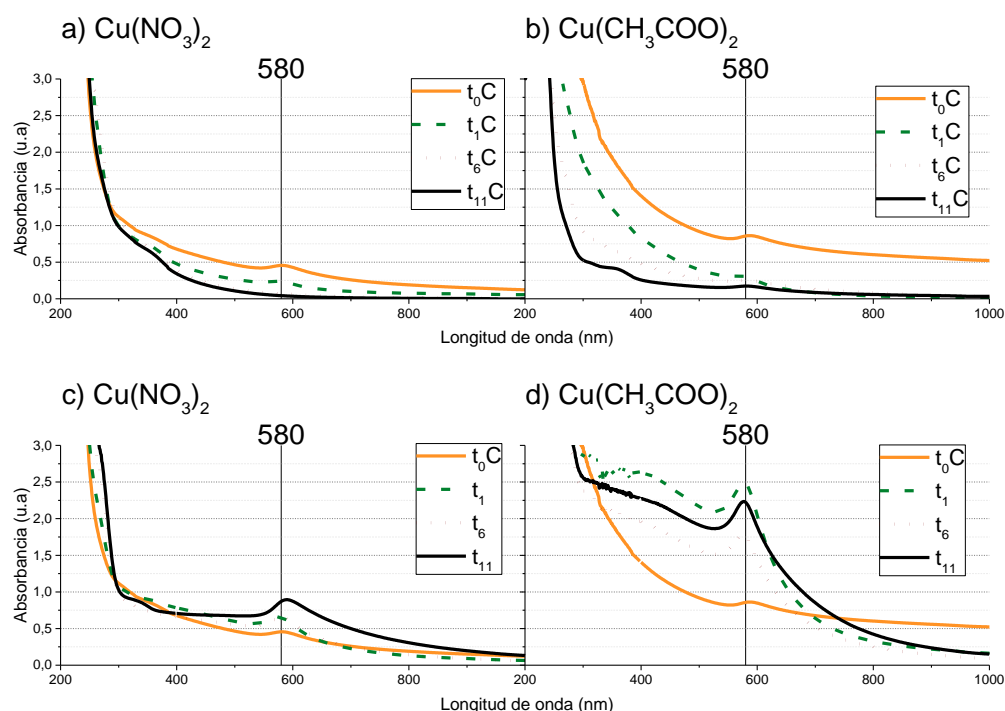
Para estudiar la influencia de las partículas de gran tamaño sobre la estabilidad de las suspensiones de CuNp obtenidas a partir de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , se almacenó una alícuota sin centrifugar y otra centrifugada el día de la síntesis (CuNp y  $t_0\text{C}$ , respectivamente, ver esquema de trabajo en la Figura 4.15). Por un lado se tomaron muestras a partir de la suspensión de CuNp el día de la síntesis ( $t_0\text{C}$ ) y luego de 1, 6 y 11 días ( $t_1\text{C}$ ,  $t_6\text{C}$  y  $t_{11}\text{C}$ , respectivamente), cada una centrifugada y diluida antes de realizar las determinaciones (indicado con la letra C). Además, se observó la muestra  $t_0\text{C}$  a lo largo del de tiempo ( $t_1$ ,  $t_6$  y  $t_{11}$ ), sin centrifugaciones ni diluciones posteriores.





**Figura 4.15. Estabilidad coloidal de las CuNp.** Esquema de trabajo realizado para estudiar la estabilidad de las suspensiones mediante DLS y UV-vis.

En la Figura 4.16 se presentan los espectros UV-vis de las CuNp preparadas a partir de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Las gráficas 4.16-a y 4.16-b muestran los espectros correspondientes a las suspensiones  $t_0\text{C}$ ,  $t_1\text{C}$ ,  $t_6\text{C}$  y  $t_{11}\text{C}$ , es decir almacenadas en presencia de partículas de gran tamaño hasta el día de ser evaluadas. Los espectros indican, para ambos precursores, pérdida de intensidad del SPR a lo largo del tiempo. Esto indica que tras centrifugar parte de las partículas se pierden en el precipitado, disminuyendo la concentración de CuNp en suspensión. A su vez, el sobrenadante de las muestras  $t_1\text{C}$ ,  $t_6\text{C}$  y  $t_{11}\text{C}$  de ambos precursores presentan una elevada polidispersidad (indicado con \* en la Tabla 4.1). Por otro lado, las gráficas 4.16-c y 4.16-d muestran la evolución en el tiempo de la muestra  $t_0\text{C}$  ( $t_1$ ,  $t_6$  y  $t_{11}$ ). Los espectros reflejan que cuando las suspensiones se almacenaron libres de partículas grandes ( $t_0\text{C}$ ), resultaron más estables, indicado por la permanencia del SPR en el tiempo, para ambos precursores  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Además, esto se evidenció por una distribución de tamaños más homogénea con menor polidispersidad (Tabla 4.1) y por un aumento en la intensidad de color de las suspensiones (Figura 4.17) [39, 40].

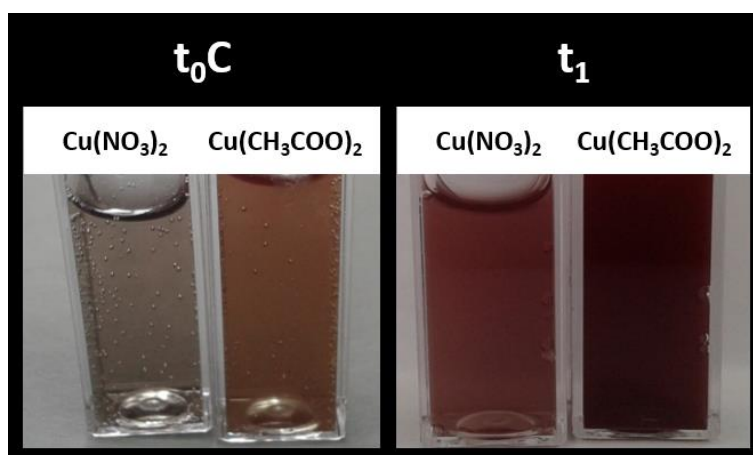


**Figura 4.16. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ .** Influencia del precursor y el tiempo de almacenamiento sobre el SPR. Precursores:  $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$ . Tiempo: ( $t_0$ ) día de síntesis, ( $t_n$ ) n días de almacenamiento, C: muestra centrifugada. a) y b) Suspensión de CuNp almacenadas en presencia de partículas grandes. c) y d) Suspensión  $t_0C$ , libre de partículas grandes.

**Tabla 4.1. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ .** Influencia del tipo de precursor ( $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$ ) y tiempo de almacenamiento sobre el diámetro hidrodinámico de las partículas ( $t_0$ : día de síntesis,  $t_n$ : n días de almacenamiento).

Muestra		Tamaño (nm)		SD	IPD
$Cu(NO_3)_2$	$t_0C$	126,2	±	0,9	0,3
	$t_1C$	82,6	±	2,1	0,4
	$t_6C^*$	94,2	±	1,2	0,3
	$t_{11}C^*$	128,7	±	8,1	0,5
	$t_1$	83,9	±	1,6	0,4
	$t_6$	95,7	±	1,4	0,3
	$t_{11}$	112,4	±	2,8	0,3
$Cu(CH_3COO)_2$	$t_0C$	182,7	±	1,6	0,2
	$t_1C^*$	43,7	±	2,9	0,6
	$t_6C^*$	48,3	±	0,6	0,5
	$t_{11}C^*$	57,1	±	0,7	0,5
	$t_1$	109,2	±	0,6	0,3
	$t_6$	97,5	±	0,9	0,3
	$t_{11}$	97,9	±	0,9	0,3

C: Muestra centrifugada. \*: El resultado no cumple con los criterios de calidad porque la muestra presenta agregados o sedimento.



**Figura 4.17. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ .** Fotografías digitales de suspensiones preparadas con  $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$  los días  $t_0C$  y  $t_1$  (día de síntesis y a las 24h, respectivamente. C: muestra centrifugada.

Los resultados indican que, si bien con las sales  $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$  los procesos serían más controlados que con  $CuSO_4$  y  $CuCl_2$ , en principio se estarían produciendo partículas que continúan creciendo hasta formar grandes agregados, haciendo que las partículas precipiten luego de un determinado período de tiempo. Esto podría deberse al fenómeno de “maduración de Ostwald” [41], el cual establece la formación de partículas más grandes a expensas de la desaparición de las de menor tamaño. De manera que se produce un aumento del tamaño medio de partículas y disminuye la concentración de partículas de tamaño nanométrico. Esto explicaría la disminución de la intensidad del SPR y un aumento en la dispersión de tamaños. En cambio, al eliminar las partículas grandes mediante centrifugación y conservando el sobrenadante, los núcleos ya formados continuarían creciendo de manera más manteniendo tamaños nanométricos, lo cual se evidencia por el aumento de la intensidad del SPR y el aumento de la intensidad de color durante el almacenamiento.

A su vez, al comparar ambos precursores, se observa que con  $Cu(CH_3COO)_2$  el SPR alcanza intensidades mayores que con  $Cu(NO_3)_2$  (Figuras 4.16-d y 4.16-c), manteniendo un tamaño medio y un IPD más estables en el tiempo ( $t_0C$ ,  $t_1$ ,  $t_6$  y  $t_{11}$  en Tabla 4.1). Estas evidencias, podrían sugerir que el uso de  $Cu(CH_3COO)_2$  permitiría un mayor control de las velocidades entre los procesos de nucleación y crecimiento respecto de los otros

precursores. Por lo tanto se obtienen CuNp más estables y con una distribución de tamaños más homogénea.

De esta manera, se deduce que para la reacción de reducción con  $N_2H_4$ , la velocidad de formación de las CuNp en función del precursor utilizado resulta  $CuCl_2 \gg CuSO_4 \gg Cu(NO_3)_2 > Cu(CH_3COO)_2$ . Por este motivo se seleccionó  $Cu(CH_3COO)_2$  como sal precursora para continuar con las demás experiencias.

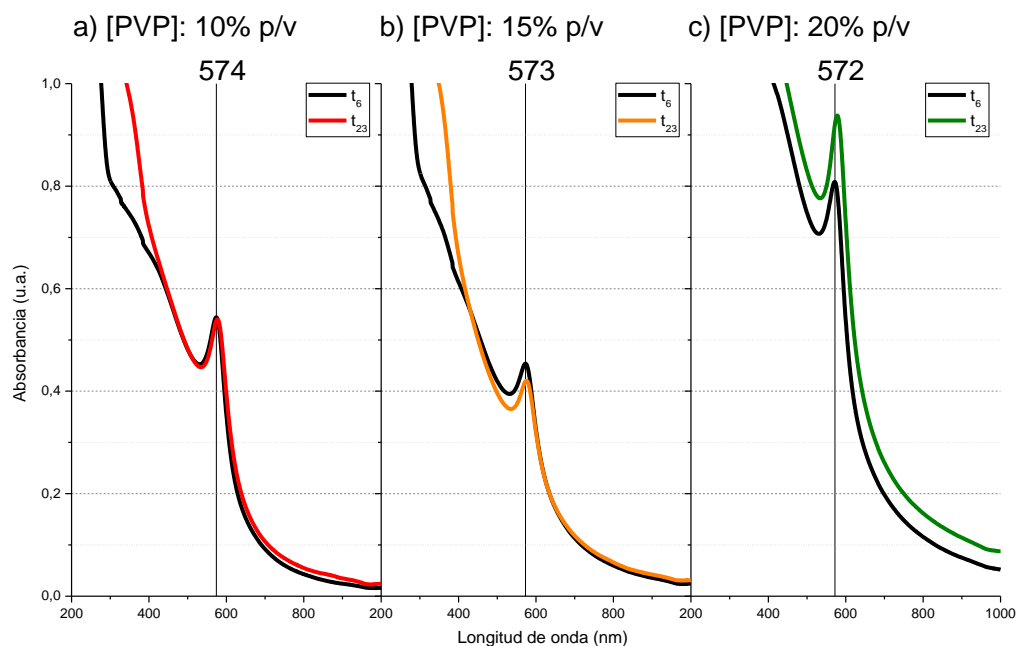
#### 4.3.1.3. Influencia de la concentración de PVP

Con el objetivo de disminuir la formación de precipitado y mejorar la estabilidad de las CuNp se estudió el efecto de la concentración del agente protector, proponiendo diferentes concentraciones de PVP ([PVP]); 10%, 15% y 20 % p/v.

En la Tabla 4.2 se muestran los radios hidrodinámicos y en la Figura 4.18 los resultados de espectroscopia UV-vis del sobrenadante de las CuNp sintetizadas con las tres concentraciones de polímero. Las evaluaciones se realizaron luego de 6 y 23 días de almacenamiento ( $t_6$  y  $t_{23}$ ). Del análisis de los resultados, se observa que a medida que la [PVP] aumenta, el tamaño medio de partícula a  $t_6$  resultó de 75, 132 y 126 nm y el SPR se centró en 574, 573 y 572 nm, para 10%, 15% y 20% de PVP, respectivamente.

**Tabla 4.2. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Influencia de la concentración de PVP sobre el diámetro hidrodinámico de las partículas. [PVP]: 10%, 15% y 20% p/v,  $t_n$ : n días de almacenamiento.**

Muestra		Tamaño (nm)		SD	IPD
10%	$t_6$	75,0	±	1,0	0,3
	$t_{23}$	74,3	±	1,4	0,3
15%	$t_6$	131,5	±	3,2	0,3
	$t_{23}$	135,4	±	1,8	0,3
20%	$t_6$	125,6	±	2,6	0,4
	$t_{23}$	122,7	±	1,5	0,4

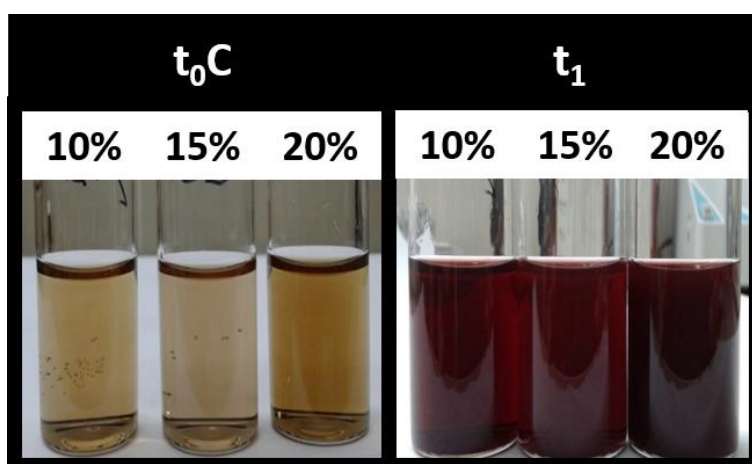


**Figura 4.18. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Influencia de la concentración de PVP y tiempo de almacenamiento sobre el SPR. [PVP]: 10%, 15% y 20% p/v y  $t_n$ : n días de almacenamiento.**

Los resultados reflejan que el aumento de la cantidad de PVP que rodea a las partículas genera un aumento del radio hidrodinámico de las CuNp. Sin embargo, se observa un corrimiento en la posición del SPR a menores longitudes de onda, que podría asociarse con una disminución del tamaño de CuNp [10-12]. Esto coincide con lo reportado por Tang y col. [21] quienes, a través de micrografías de TEM, concluyeron que el aumento de la [PVP] restringe el crecimiento de las partículas y por lo tanto disminuye el tamaño promedio de las CuNp.

Los resultados reflejan que las tres muestras resultaron estables hasta 23 días de almacenamiento ( $t_{23}$ , Figura 4.18). Sin embargo, la muestra con 20% p/v de PVP, que presenta mayor intensidad en el espectro UV-vis, gelifica durante su almacenamiento. El PVP gelifica en solución acuosa por reacción con una base fuerte, persulfatos inorgánicos o peróxidos y el grado de gelificación aumenta con la [PVP], por la mayor eficiencia de entrecruzamiento en soluciones concentradas [42]. Por lo tanto, la presencia de  $N_2H_4$  podría promover la gelificación de la suspensión. No obstante, el aumento de la [PVP] no impidió la formación de precipitado en el momento de la síntesis, por lo que en los tres casos se debió centrifugar.

En la Figura 4.19 se observa nuevamente que la intensidad del color aumenta con el paso del tiempo. Esto coincide con lo observado anteriormente al estudiar los diferentes precursores. La eliminación de las partículas grandes conduce a que los núcleos crezcan de manera controlada, dando lugar a la formación de nanopartículas y el consecuente aumento de la intensidad de color ( $t_1$ ).



**Figura 4.19. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Fotografías digitales de suspensiones preparadas con [PVP]: 10%, 15% y 20% p/v, los días  $t_0C$  y  $t_1$  (día de síntesis y a las 24h, respectivamente). C: muestra centrifugada.**

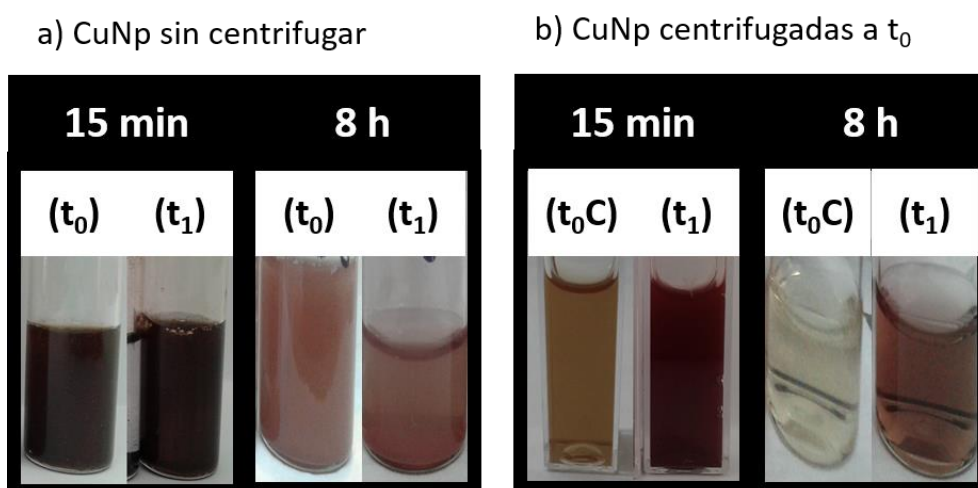
En vista a estos resultados, se fijó en 10% p/v la [PVP] para continuar con el estudio. En efecto, el aumento de la [PVP] no impidió la formación de precipitado en el momento de la síntesis y no se observaron diferencias significativas en la estabilidad del pico de SPR y la dispersión de tamaños de partículas.

#### 4.3.1.4. Influencia del tiempo de agitación

La velocidad y el tiempo de agitación es otro factor que determina el proceso de la nucleación y crecimiento de las partículas. Por lo que también se evaluó su efecto sobre la formación de precipitado. Se analizaron dos tiempos de agitación 15 min y 8 h sobre la síntesis de CuNp preparadas con iguales condiciones de concentración de reactivos y temperatura.

La Figura 4.20 muestra imágenes digitales de las suspensiones obtenidas con ambos tiempos de agitación, sin centrifugar y centrifugadas a  $t_0$ , almacenadas durante 24 h ( $t_1$ ). En el caso de las muestras conservadas sin centrifugar (Figura 4.20-a) se observa a simple

vista que con 15 min de tiempo de agitación las CuNp se mantienen en suspensión hasta  $t_1$ . En cambio con 8 h se forman partículas de gran tamaño que decantan luego de  $t_1$ . Por otro lado, en las muestras centrifugadas (Figura 4.20-b) se observa un aumento en la intensidad de color durante el almacenamiento.

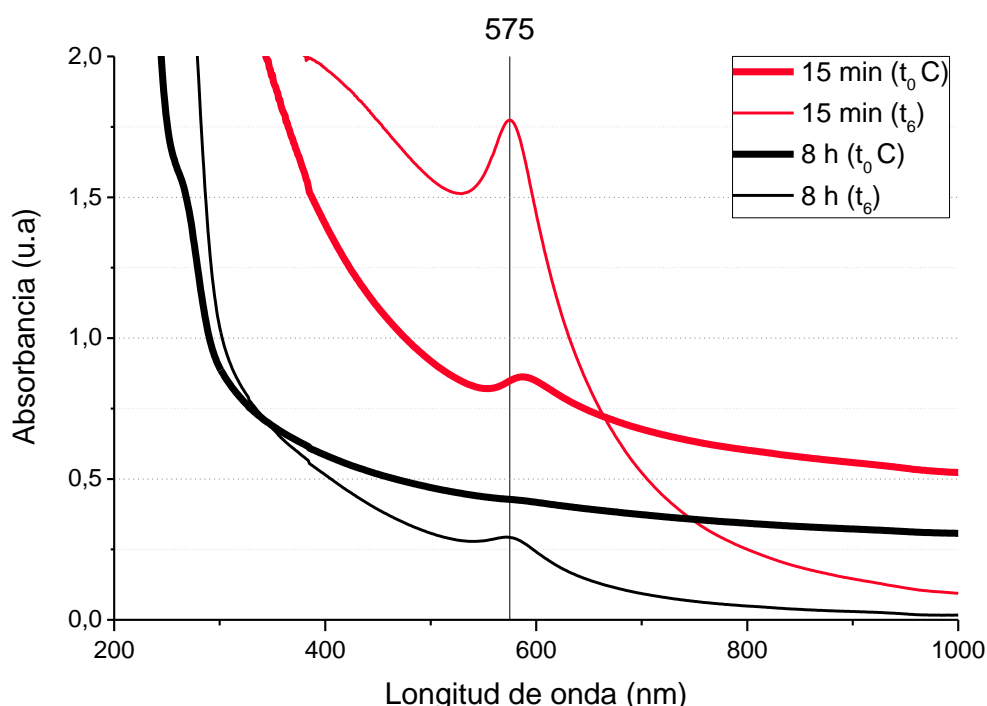


**Figura 4.20. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ .** Fotografías digitales de suspensiones preparadas con tiempo de agitación de 15 min y 8h, tomadas los días  $t_0C$  y  $t_1$  (día de síntesis y a las 24 h, respectivamente). C: muestra centrifugada.

Esto coincide con los resultados obtenidos del análisis de los espectros UV-vis de las muestras centrifugadas a  $t_0$  y almacenadas durante 6 días ( $t_6$ ) (Figura 4.21). Los espectros muestran que luego de 15 min de agitación (15 min- $t_0C$ ) comienza a distinguirse el plasmon alrededor de 575 nm y mientras que después de 8 h (8h- $t_0C$ ) este no se detecta. Sin embargo, en ambos casos, la intensidad del SPR aumenta con el tiempo de almacenamiento (15 min- $t_6$  y 8 h- $t_6$ ), siendo mayor para la síntesis con menor tiempo de agitación.

Estos resultados señalan que el incremento del tiempo de agitación no favorece a la formación de CuNp de menor tamaño. Sino que por el contrario, tras mantener 8 h en agitación las partículas resultaron más grandes precipitando luego de 24 h de almacenamiento (8 h- $t_1$ , Figura 4.20-a). A su vez, al conservar el sobrenadante libre de partículas grandes ( $t_0C$ ), se observó que para el caso de 8 h de agitación se obtuvo una suspensión con menor intensidad de color (8 h- $t_0$ , Figura 4.20-b) y menor magnitud en el SPR (8h- $t_6$ , Figura 4.21), sugiriendo una menor concentración de partículas en

suspensión. En cambio, las muestras con 15 min de agitación alcanzan a reducirse formando CuNp, lo cual se comprueba por el color de las suspensiones (Figura 4.20) y mediante la presencia del SPR (15 min- $t_0$ , Figura 4.21). Luego de un día de almacenamiento se observa aumento de la intensidad del SPR (15 min- $t_6$ , Figura 4.20) y cambio de color de marrón a rojo vino indicando mayor concentración de CuNp (15 min- $t_1$ , Figura 4.21-b) [1].



**Figura 4.21. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ .** Influencia del tiempo de agitación en el SPR, evaluados los días  $t_0C$  y  $t_6$  (día de síntesis y a los 6 días, respectivamente). Tiempos de agitación 15 min y 8 h. C: muestra centrifugada.

Esto podría deberse a que tiempos de agitación prolongados dan lugar al fenómeno de “maduración de Ostwald” y contribuyendo al crecimiento de las partículas. A su vez, un mayor tiempo de agitación genera un aumento de la concentración de  $O_2$  disuelto y provocando la eliminación de  $N_2$ , favoreciendo la oxidación de las partículas [8].

Por último, al igual que en el estudio de precursores y [PVP], se observó el incremento en la intensidad de color de las suspensiones durante el almacenamiento, lo cual puede ser resultado del aumento de la concentración de CuNp tras la eliminación por



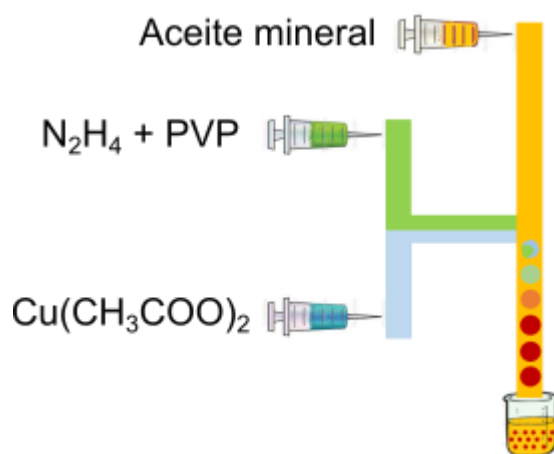
centrifugación de partículas de gran tamaño. Además, en todas las experiencias, las suspensiones se conservaron en recipientes cerrados de manera que se conservó una atmósfera inerte generada por el  $N_2$  liberado durante la descomposición de la  $N_2H_4$  protegiendo las partículas de la oxidación [6].

Con estos resultados y habiendo establecido el conjunto de variables óptimas se plantea la evaluación del sistema continuo. El tiempo de residencia se ajustó evaluando las relaciones de caudales tal que permitan observar el cambio de color en el interior del microrreactor.

#### 4.3.2. Síntesis en sistema continuo

Los resultados obtenidos en el sistema discontinuo mostraron un precipitado que se separó por centrifugación y se monitoreó el comportamiento del sobrenadante; observándose, a partir de esto, la formación de CuNp a lo largo del tiempo de almacenamiento. Estas observaciones reflejan la sensibilidad paramétrica de la reacción abordada. De esta manera, con el objetivo de lograr un óptimo control de la nucleación y del crecimiento de las partículas luego de la reacción de reducción, se planteó evaluar la síntesis de CuNp mediante sistema continuo de flujo segmentado.

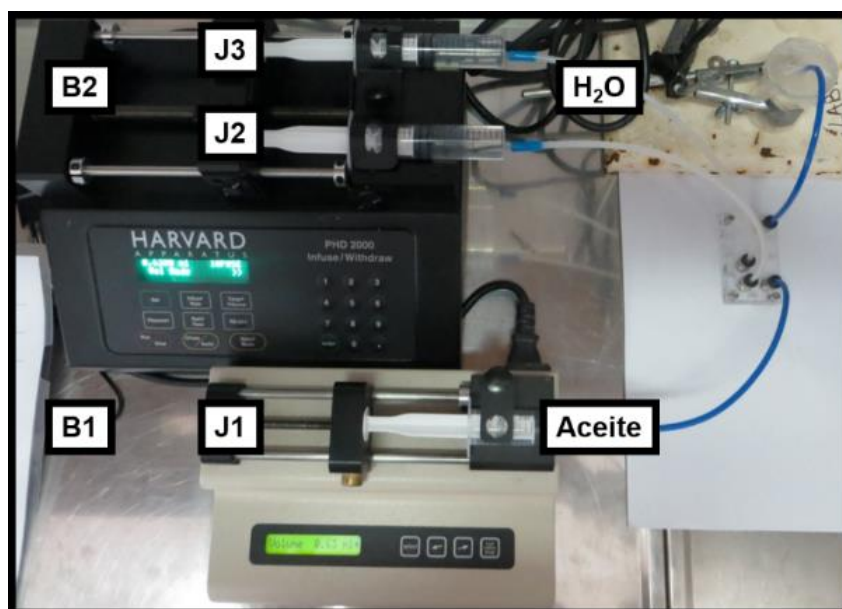
El sistema de flujo segmentado propuesto (Figura 4.22) consistió en generar un flujo de microgotas de agua al mezclar dos fases acuosas con una fase oleosa mediante un micromezclador de acrílico tipo “K” con salida en forma de canal recto. Una de las fases acuosas para la  $H_2N_4$  y el PVP y la otra para la solución de  $Cu(CH_3COO)_2$ .



**Figura 4.22. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado. Esquema propuesto para el sistema de síntesis.**

#### 4.3.2.1. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de canal recto

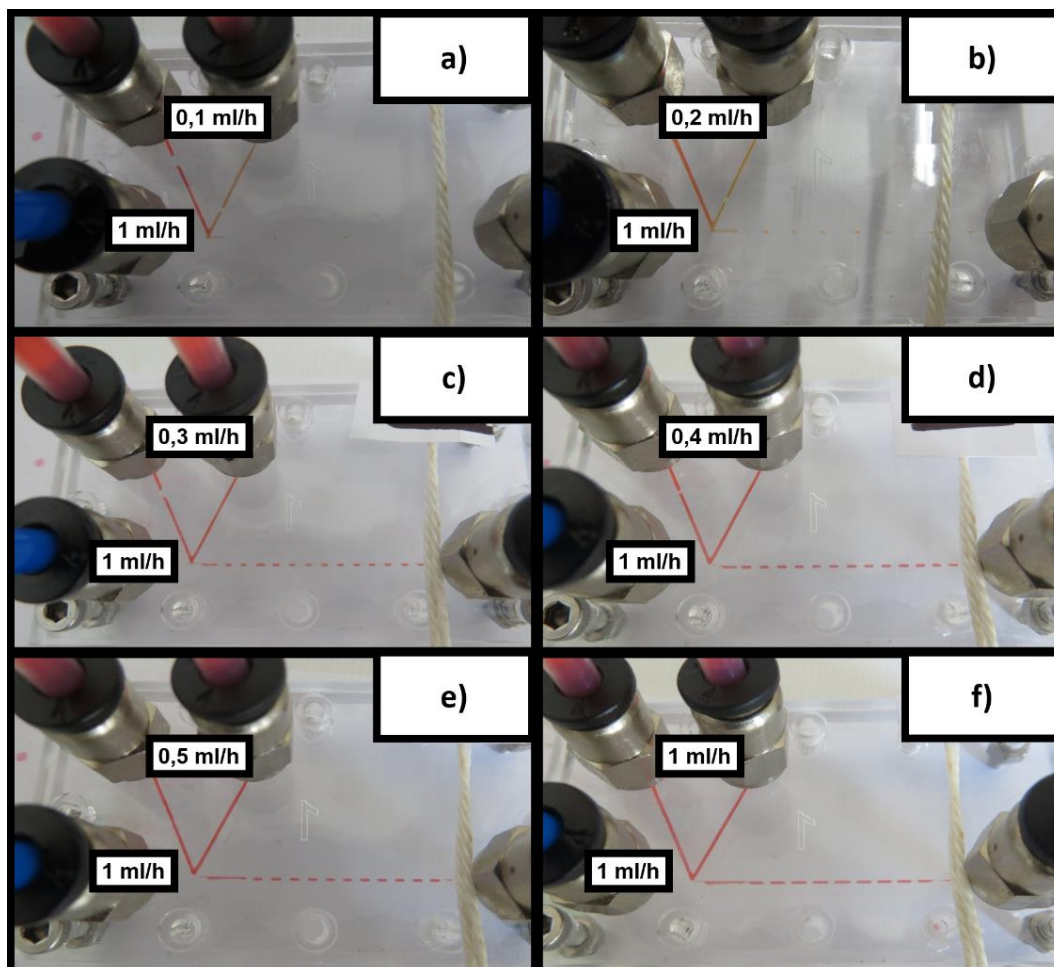
En una primera etapa debió realizarse la puesta a punto de la generación del flujo de microgotas mezclando una fase oleosa (aceite mineral, Sigma - Aldrich) con dos fases acuosas coloreadas sin los reactivos. Esta tarea involucró acondicionar la relación de caudales entre ambas fases para lograr un flujo segmentado homogéneo. En la Figura 4.23 se muestra el sistema utilizado. Se emplearon dos bombas de jeringas, una sencilla (B1) y la otra doble (B2). La B1 impulsa la jeringa J1 conteniendo la fase oleosa inerte y la otra para impulsar las jeringas conteniendo las fases acuosas reactivas o, como en este caso, en este caso la coloreada (J2 y J3).



**Figura 4.23. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de acrílico con canal recto.** Fotografía digital del sistema empleado para la optimización de la formación de microgotas.

Las imágenes de la Figura 4.24 muestran los regímenes de microgotas formados a través de distintas relaciones de caudales. Las relaciones evaluadas ( $r_q$  = caudal de las fases acuosas/caudal de la fase oleosa en ml/h) fueron  $r_q = 0,1/1$ ,  $0,2/1$ ,  $0,3/1$ ,  $0,4/1$ ,  $0,5/1$  y  $1/1$  (Figura 4.24-a, b, c, d y f, respectivamente). Se observa que a medida que el caudal de la fase acuosa aumenta, se incrementa el tamaño de las gotas formadas [43-46]. Además, en un determinado momento se advierte que inmediatamente después de la

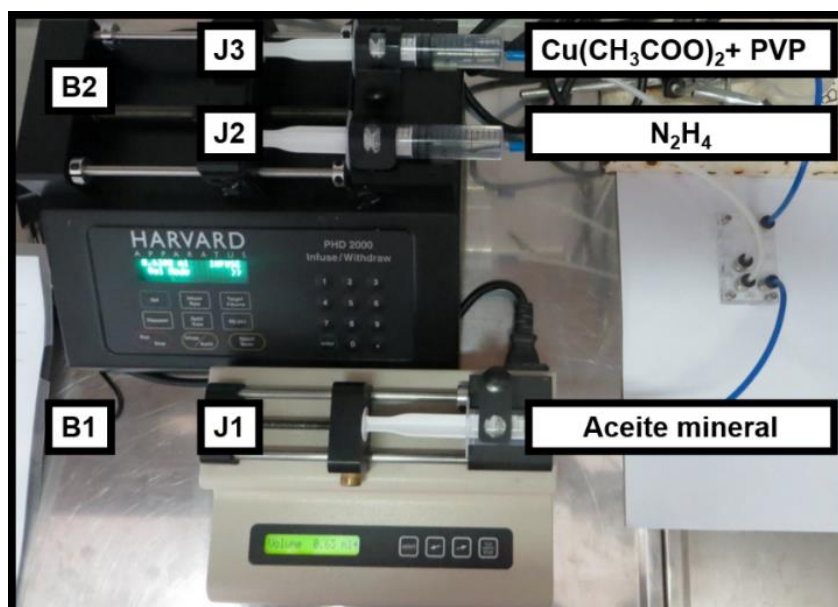
unión de las dos fases parte de la fase acuosa queda adherida a la pared y que, con el paso del tiempo, aumenta la longitud de la zona de adherencia. Para evaluar la reacción de síntesis de CuNp se seleccionaron  $r_q = 0,1/1$ ,  $0,5/1$  y  $1/1$ .



**Figura 4.24. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de acrílico con canal recto.** Fotografías digitales de los regímenes de micorgotas. a)  $r_q = 0,1/1$ , b)  $r_q = 0,2/1$ , c)  $r_q = 0,3/1$ , d)  $r_q = 0,4/1$ , e)  $r_q = 0,5/1$  y f)  $r_q = 1/1$ . La fase coloreada es acuosa.

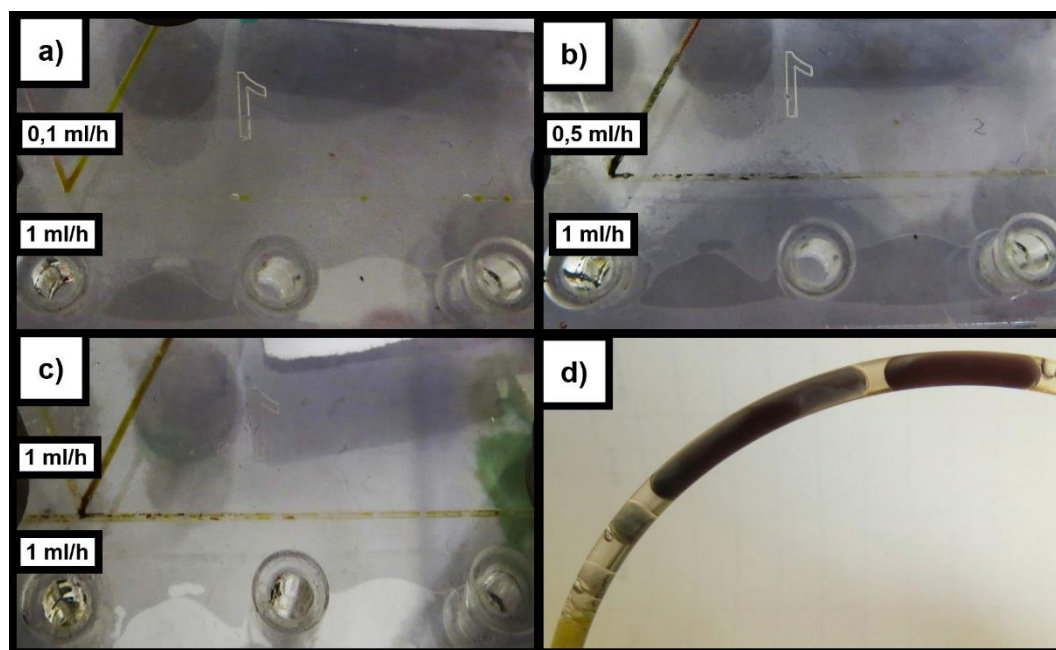
#### 4.3.2.2. Síntesis de CuNp con micromezclador de canal recto

Una vez logrado optimizar el flujo segmentado se evaluó la reacción de reducción. Para ello se colocó en una jeringa J1 la fase oleosa, en la J2 una solución de  $N_2H_4$  y en J3 una solución con  $Cu(CH_3COO)_2$  y PVP (Figura 4.25).



**Figura 4.25. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Fotografía digital del sistema empleado para la síntesis mediante el método continuo con fase segmentada.**

En las Figuras 4.26-a, b, y c se muestran los regímenes obtenidos con las  $rq = 0,1/1$ ,  $0,5/1$  y  $1/1$ , respectivamente. En los tres casos fue posible reproducir el flujo de gotas obtenidos anteriormente (Figura 4.24-a, e y f). De las fotografías se observa que el flujo correspondiente a la fase acuosa conteniendo la solución de Cu se contaminó ya que el color naranja indica que tuvo contacto con  $N_2H_4$  por un reflujo generado al realizar las conexiones de las tuberías. A medida que transcurrió el tiempo, se fue generando un depósito de Cu sobre las paredes del canal en la zona de la unión “K”, donde se unen las corrientes conteniendo el Cu y la  $N_2H_4$ . En los tres casos el cambio de color en el interior de las microgotas se produjo en el interior de la tubería de salida ( $L = 21,4$  cm,  $D_i = 0,2$  cm, Figura 4.26-d). La transición de color fue de naranja a rojo vino, indicando la formación de CuNp. Sin embargo, se observa que el régimen de microgotas no se mantuvo uniforme hasta la salida debido al cambio de diámetro interno entre el canal del micromezclador y la tubería de salida. También se detectó la presencia de burbujas producto de la formación de  $N_2(g)$  durante la reacción de reducción con  $N_2H_4$  [47].

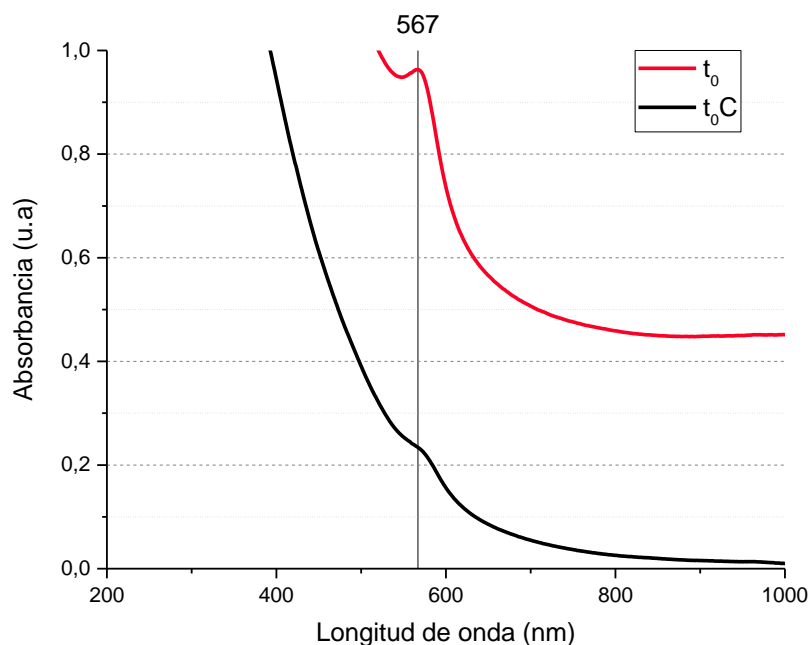


**Figura 4.26.** Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Imágenes digitales de los regímenes de microgotas formados  $r_q = a) 0,1/1$ ,  $b) 0,5/1$  y  $c) 1/1$ .  $d)$  Fracción de la tubería de salida ( $r_q = 1/1$ ).

A partir de la reacción llevada a cabo con  $r_q = 1/1$  se recolectó un volumen de fase acuosa con CuNp en suspensión. Se analizó la señal de SRP (Figura 4.27) y el tamaño hidrodinámico (Tabla 4.3), antes y después de centrifugar. A partir del espectro UV-vis se comprobó la presencia de CuNp por la SPR en 567 nm, que luego de centrifugar disminuyó en intensidad y la banda se desplazó hacia una mayor longitud de onda. Esto indica la presencia de partículas grandes, lo cual coincide con los datos de tamaño hidrodinámico antes de centrifugar que arrojaron un diámetro de  $164,5 \pm 10,4$  nm y un alto índice de polidispersidad  $IPD = 0,6$  ( $t_0$ , Tabla 4.3). Si bien, luego de centrifugar el tamaño y el  $IPD$  resultaron menores ( $99 \pm 4$  nm,  $IPD=0,4$ ,  $t_0C^*$ , Tabla 4.3), el resultado no cumplió con los criterios de calidad para el análisis por presentar un elevado  $IPD$  (indicado con \* en la Tabla 4.3).

Al comparar las CuNp obtenidas mediante los sistemas discontinuo y continuo, luego de ser centrifugadas ( $t_0C$ ), se distingue que la SPR presentó un corrimiento de 580 (Figura 4.16-d) a 567 nm (Figura 4.27), lo que se relaciona con el menor diámetro promedio, 182,7 nm (Tabla 4.1) y 99 nm (Tabla 4.3), respectivamente. Sin embargo, la síntesis en

continuo con flujo segmentado dio lugar a una suspensión con mayor polidispersidad con presencia de agregados o sedimentos (IPD = 0,2 y 0,4, respectivamente).



**Figura 4.27. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Espectros UV-vis de CuNp obtenidas con  $r_q = 1/1$  a  $t_0$ . C: muestra centrifugada.**

**Tabla 4.3. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Diámetros hidrodinámicos de partículas obtenidas con  $r_q = 1/1$  a  $t_0$ . (C: muestra centrifugada).**

Muestra	Tamaño (nm)	SD	IPD
$t_0$	164,0 ±	10,4	0,6
$t_0C^*$	99,0 ±	4,0	0,4

C: Muestra centrifugada. \*: El resultado no cumple con los criterios de calidad porque la muestra presenta agregados o sedimenta.

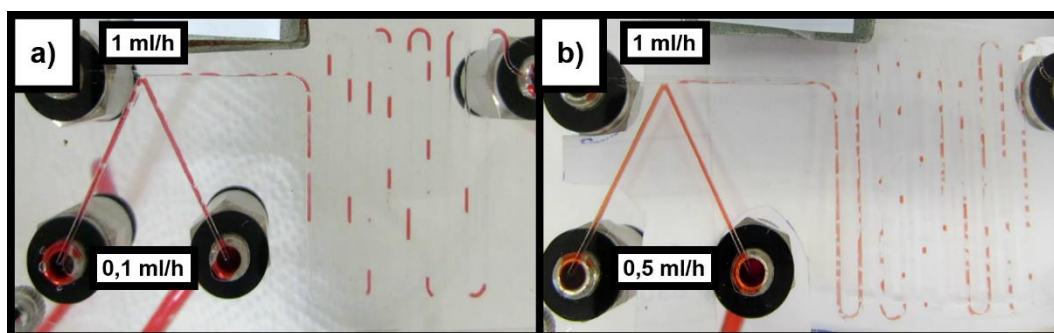
La causa por la cual el modelo de síntesis en continuo de flujo segmentado no logró controlar el tamaño de partículas, evitando la polidispersidad, puede explicarse por dos motivos: (i) por un lado el cambio en el diámetro interno del canal del micromezclador y el de la tubería de salida, (ii) el tiempo de reposo (toda la noche) de la suspensión recolectada. En el primer caso las gotas pierden uniformidad y en el segundo, durante el tiempo de recolección estanco las nanopartículas siguen el proceso de crecimiento.



### 4.3.2.3. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de canal en serpentina

El objetivo de emplear un micromezclador de acrílico tipo “K” para llevar la reacción de reducción mediante un sistema continuo de flujo segmentado consistió en controlar el proceso de nucleación y crecimiento. A través del diseño con salida en forma recta, no se logró completar la reacción dentro del micromezclador. Por lo tanto, con el objetivo de aumentar el tiempo de residencia para que el cambio de color se produzca en el interior del micromezclador, se confeccionó un nuevo diseño con el canal de salida dispuesto en forma de serpentina. Al igual que con el diseño anterior, primero se procedió a optimizar la relación de caudales de agua y aceite para lograr un flujo de gotas segmentado homogéneo.

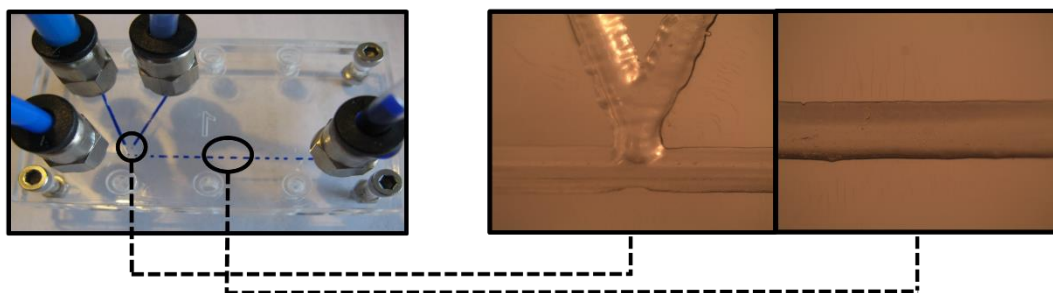
Nuevamente, se modificó el caudal de las fases acuosas dejando constante la fase oleosa. Se evaluó  $rq = 0,1/1$ ,  $0,2/1$ ,  $0,3/1$ ,  $0,4/1$  y  $0,5/1$ . Sin embargo no se obtuvo un régimen de gotas uniforme. En la Figura 4.28 se muestran imágenes de los flujos obtenidos con  $rq = 0,1/1$  y  $rq = 0,5/1$ . En ambos casos se observa que la fase acuosa se adhirió a la pared del canal del microrreactor impidiendo la formación regular de gotas.



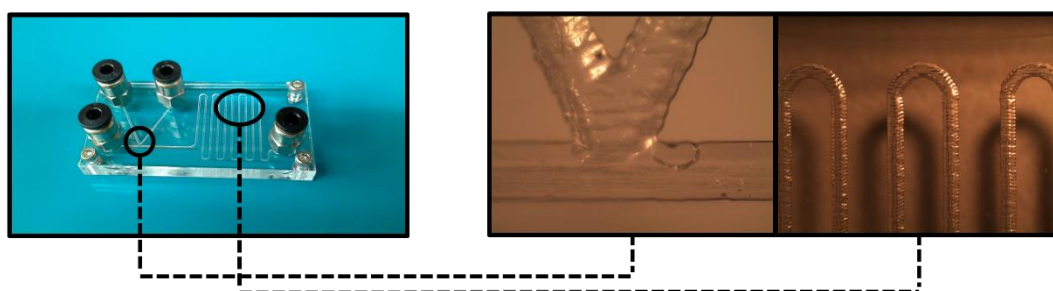
**Figura 4.28. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de acrílico con canal en forma de serpentina.** Fotografías digitales de los regímenes de microgotas. a)  $rq = 0,1/1$  y b)  $rq = 0,5/1$ . La fase coloreada es acuosa.

Al observar mediante microscopio óptico las paredes de los micromezcladores utilizados se observó que el diseño con serpentina presenta mayor rugosidad que el de forma recta (Figura 4.29). Esto podría favorecer la interacción entre la fase acuosa y la pared dando lugar a la adherencia. Sin embargo, no se esperaría este efecto de adherencia ya que el acrílico es un material hidrofóbico.

a) Microreactor con canal recto



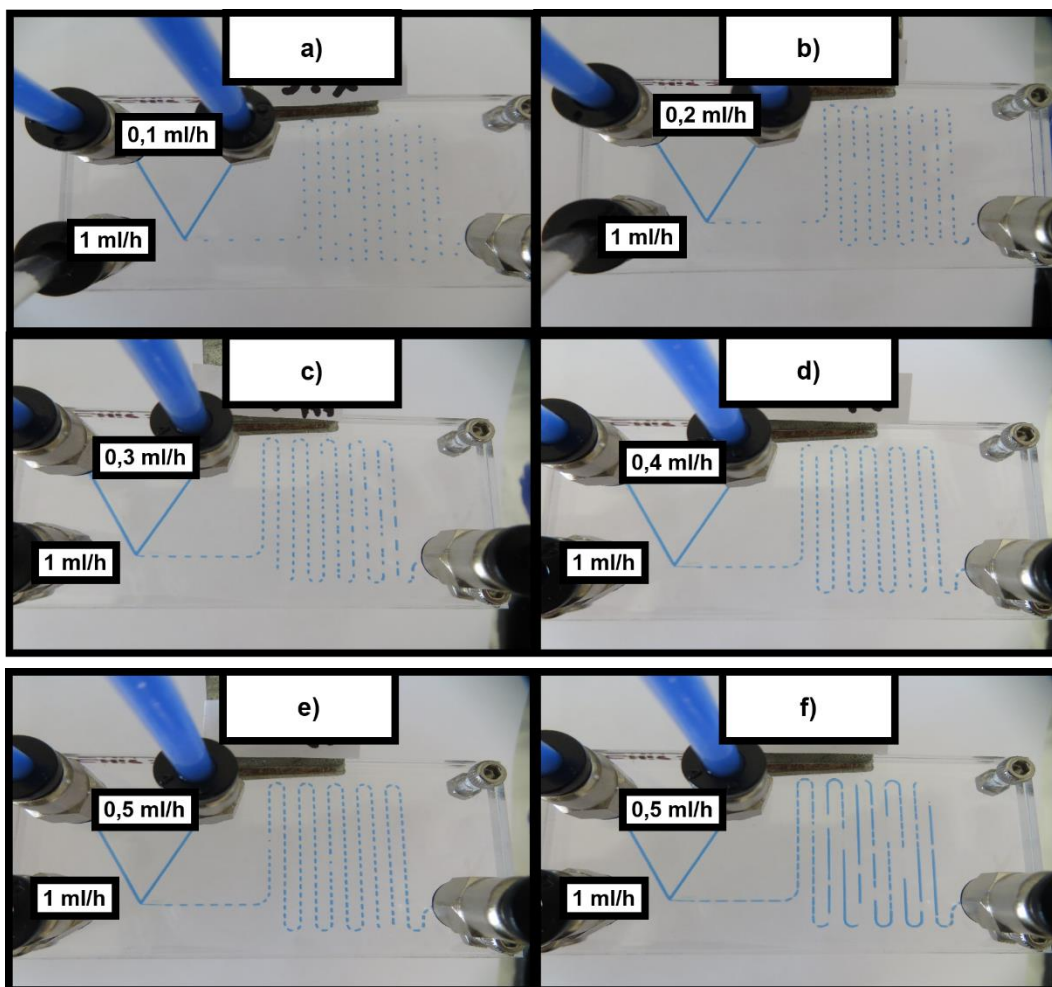
b) Microreactor con canal en forma de serpentina



**Figura 4.29. Micromezcladores de acrílico tipo “K”.** Imágenes digitales y de microscopio óptico de los micromezcladores con canal de salida en forma a) recta y b) serpentina.

En este sentido, se propuso mantener el micromezclador con aceite en forma estanca durante un largo tiempo (4 meses). Luego se repitieron las pruebas con  $rq = 0,1/1$ ,  $0,2/1$ ,  $0,3/1$ ,  $0,4/1$  y  $0,5/1$  (Figura 4.30-a, b, c, d y e, respectivamente). En todos los casos fue posible lograr un régimen de gotas aproximadamente constante. Se concluye que con este tratamiento los efectos por rugosidad de los canales se anulan. A medida que aumenta el caudal de las fases acuosas el tamaño de las gotas aumenta debido a que el tiempo de residencia en el interior del microrreactor aumenta y las gotas tienen mayor recorrido. En el caso de la  $rq = 0,5/1$ , en la que el tamaño de gotas fue mayor, se observó que con el paso del tiempo, las gotas coalescen formando gotas grandes e irregulares (Figura 4.30-f). Por este motivo, se seleccionó la  $rq = 0,4/1$  para continuar con la evaluación de éste método de síntesis de CuNp.



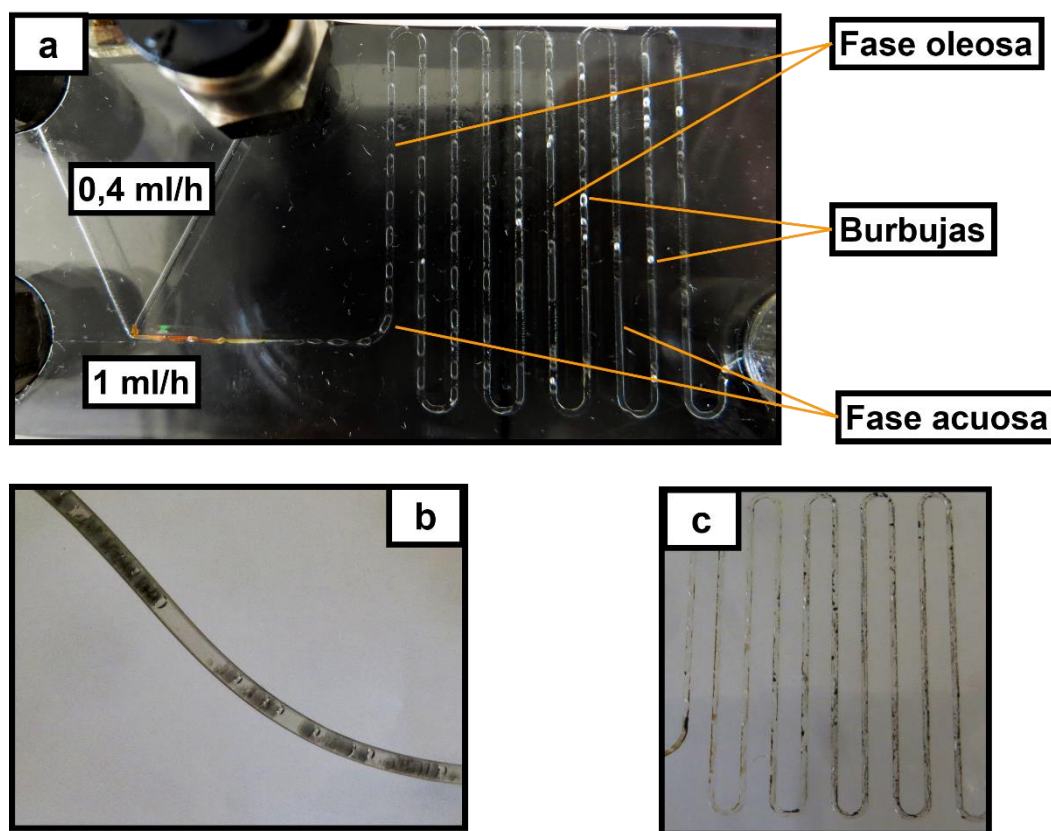


**Figura 4.30. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de acrílico con canal en forma de serpentina.** Fotografías digitales de los regímenes de microgotas. a)  $rq = 0,1/1$ , b)  $rq = 0,2/1$ , c)  $rq = 0,3/1$ , d)  $rq = 0,4/1$ , e)  $rq = 0,5/1$  y f)  $rq = 1/1$ . La fase coloreada es acuosa.

#### 4.3.2.4. Síntesis de CuNp con micromezclador de canal en forma de serpentina

Al evaluar la reacción química en el micromezclador con forma de serpentina con  $rq = 0,4/1$  se produjo la formación de microgotas (Figura 4.31-a). Pero no resultó ser un régimen regular, ya que a lo largo del canal coalescen formando gotas más grandes, tanto en el interior del micromezclador como en la tubería de salida (Figuras 4.31-a y 4.31-b). Esto se debería a la formación de una fase gaseosa debido a la liberación de  $N_2$  (g) por la descomposición de la  $N_2H_4$  y a la diferencia de diámetros internos entre el canal y la tubería. Para ambos caudales, se formó precipitado en la unión luego de 15 min

(Figura 4.31-a) y luego de 7 h se observaron depósitos de cobre a lo largo de todo el serpentín (Figura 4.31-c).



**Figura 4.31. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de en forma de serpentina. Reductor:  $N_2H_4$ . Precursor:  $Cu(CH_3COO)_2$ . Fotografías digitales ( $r_q = 0,4/1$ ): a) microgotas formadas en el serpentín en presencia de burbujas, b) fracción de la tubería de salida y c) precipitado de CuNp sobre las paredes de los canales.**

### 4.3.3. Conclusiones parciales

Para la síntesis de CuNp en medio acuoso con  $N_2H_4$  y PVP, como reductor y agente estabilizante, respectivamente, se estudió en sistema discontinuo el efecto del tipo de precursor, la [PVP] y el tiempo de agitación. Luego se evaluó la síntesis en sistema continuo de flujo segmentado, evaluando dos geometrías de micromezcladores basados chip.

En primer lugar se concluyó que el tipo de sal precursora influye en la velocidad de reacción afectando los procesos de nucleación y crecimiento. Se establece que para la reacción de reducción con  $N_2H_4$  las velocidades de formación de partículas resultan

$\text{CuCl}_2 \gg \text{CuSO}_4 \gg \text{Cu}(\text{NO}_3)_2 > \text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , siendo más estables las CuNp obtenidas con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Por otro lado, el aumento de la [PVP] genera una disminución del precipitado. Sin embargo, provoca un aumento del radio hidrodinámico de partículas. Y el aumento del tiempo de agitación tampoco beneficia el control del crecimiento de partículas, favoreciendo la formación de precipitado.

Respecto al sistema continuo de flujo segmentado, se logró la formación de microgotas, siendo más grandes a medida que se incrementó el caudal de la fase acuosa.

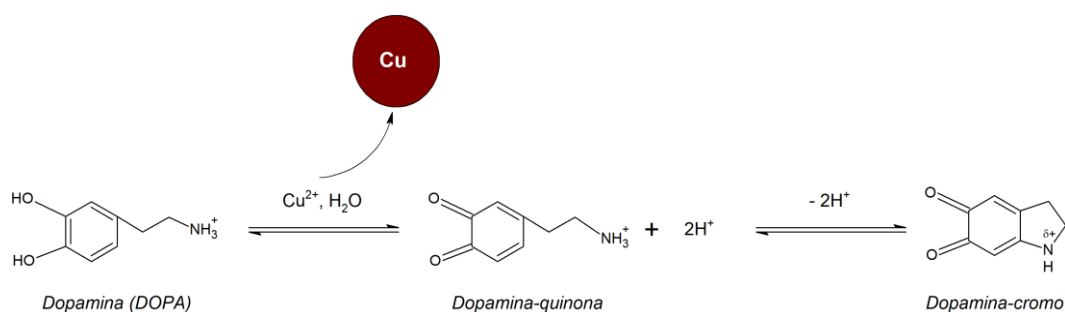
Las CuNp obtenidas utilizando micromezclador de acrílico con canal recto presentaron mayor tamaño y una menor estabilidad. Esto se atribuye a que el régimen de gotas no fue homogéneo, posiblemente debido a la diferencia de diámetro interno entre el canal del micromezclador y la tubería de salida, y a la formación de burbujas por la liberación de  $\text{N}_2$  durante la reacción de reducción. De igual manera, con el micromezclador con canal en forma de serpentín tampoco se logró un régimen de gotas homogéneo y además se generó un gran depósito de Cu sobre las paredes del canal.

Estos resultados son prometedores, y requieren un análisis más extenso en el que se continúe con el ajuste de los parámetros de síntesis para lograr suspensiones de Cu estables. Dadas las dificultades observadas con este reductor y los inconvenientes que tiene sobre el ambiente, se planteó continuar el desafío de la síntesis de CuNp estables con agentes reductores menos nocivos.

#### 4.4. Reductor dopamina

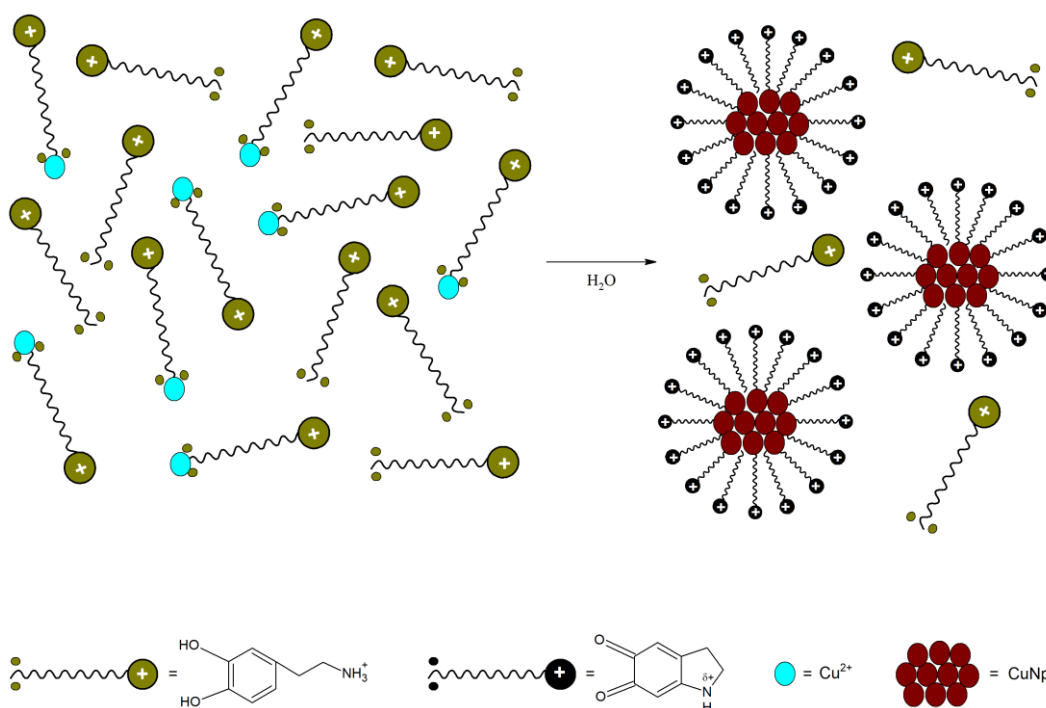
El uso de la dopamina (DOPA) como reductor para obtener CuNp resulta una alternativa viable ya que no solo es amigable con el ambiente, sino que también puede actuar como estabilizante en la suspensión de CuNp.

La DOPA cumple funciones importantes como neurotransmisor en el sistema nervioso y como reguladora del movimiento [48]. Es una catecolamina con dos grupos hidroxilos en posiciones meta y para respecto del grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) (Figura 4.32) y tiene la capacidad de reducir iones metálicos y de actuar como estabilizante de las nanopartículas en suspensión [49].



**Figura 4.32. Agente reductor: dopamina (DOPA). Reacción de reducción para la formación de CuNp [50].**

La estructura de la DOPA proporciona suficiente reducibilidad para convertir iones  $\text{Cu}^{2+}$  en CuNp. La reacción redox de la DOPA/iones de cobre se expresa en la Figura 4.32. La DOPA actúa como donante de electrones convirtiéndose en dopamina-quinona y luego en dopamina-cromo. El potencial redox de la DOPA es similar al del ácido ascórbico (0,06 V vs SCE). Por lo tanto, la especie dopamina-cromo y la DOPA constituyen un sistema redox capaz de reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$  (0,34 V vs SCE) [50]. El mecanismo estabilizador de la DOPA sobre las nanopartículas podría explicarse a partir de dos causas más probables (Figura 4.33). En primer lugar, debido a un efecto restrictivo de la DOPA en el proceso de reducción en el que los pares de electrones libres en el sistema conjugado de la DOPA pueden ocupar orbitales vacíos de los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  formando un compuesto complejo, que actúa de plantilla. De esta manera, la DOPA se cubre con iones de cobre dando lugar a la formación de CuNp pequeñas dentro de estas plantillas nanoscópicas. En segundo lugar, por el efecto de dispersión que origina el producto de oxidación dopamina-cromo sobre las CuNp luego de la reacción de reducción. El sistema conjugado con grupos carbonilo puede facilitar la complejación de CuNp a la matriz molecular y, por lo tanto, prevenir la agregación de las nanopartículas. Además, el grupo hidrófilo que contiene un átomo de nitrógeno con carga positiva hace aún más posible la estabilización de las CuNp en medios acuosos (Figura 4.33) [50]. Por último, la DOPA provee un medio fácil para generar modificaciones superficiales a través de su autopolimerización generando un recubrimiento de polidopamina sobre metales nobles, óxidos metálicos, polímeros y cerámicos [49].



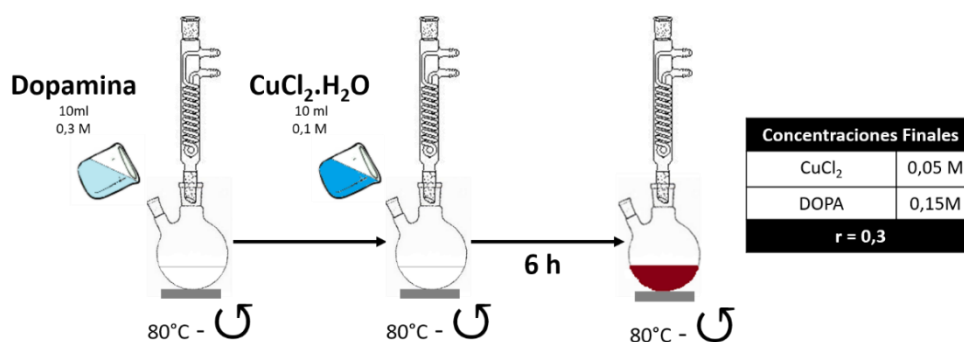
**Figura 4.33. Dopamina (DOPA) como agente reductor y estabilizante.** Esquema de la reacción de formación de las CuNp (adaptado de Xiong y col. [50]).

A continuación se presentan los resultados de la síntesis de CuNp con DOPA, en primer lugar con el sistema discontinuo y luego con el continuo.

#### 4.4.1. Síntesis en sistema discontinuo

Xiong y col. [50] emplearon  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  como precursor y DOPA como agente reductor y estabilizante. Con este protocolo compatible con el ambiente obtuvieron una suspensión de CuNp estable con partículas de 1,6 nm.

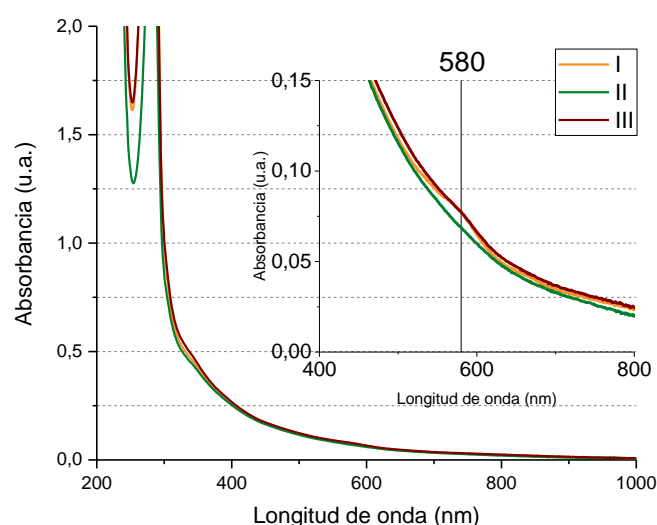
A partir del trabajo publicado por estos autores se repitió el protocolo de síntesis calentando 10 ml de una solución 0,3 M de DOPA a 80°C y agregando gota a gota 10 ml de una solución 0,1 M de  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a 80°C y manteniendo con agitación durante 6 h (Figura 4.34). Luego de este tiempo de reacción, la solución adquirió color marrón, de acuerdo con lo descrito por los autores [50].



**Figura 4.34. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: DOPA. Precursor: CuCl<sub>2</sub>. Temperatura: 80°C. Tiempo de agitación: 6h.** Esquema sugerido a partir del protocolo de Xiong y col. [50]. La tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.

Xiong y col. [50] no observaron por UV-vis la señal SPR característica de las CuNp alrededor de 570 nm y lo atribuyen a la presencia de partículas con tamaño menor a 4 nm. Los autores sostienen que dadas tan pequeñas dimensiones la señal SPR se ensancha a medida que disminuye en intensidad y lo confirman mediante el análisis de micrografías de TEM.

En la Figura 4.35 se muestra el espectro UV-vis de tres lotes de síntesis de CuNp logrados con este protocolo. En ninguno de los casos se observa el SPR alrededor de los 570 nm, característico de las CuNp, lo cual coincide con lo observado por Xiong y col. [50].

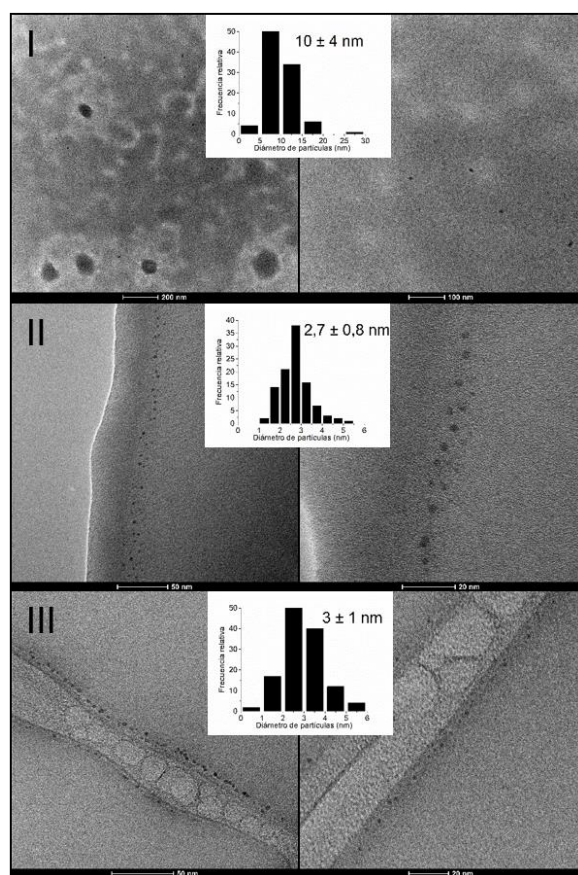


**Figura 4.35. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: DOPA. Precursor: CuCl<sub>2</sub>. Temperatura: 80°C. Tiempo de agitación: 6h.** Comparación de espectros UV-vis de tres lotes de CuNp.



Mientras que el pico a 280 nm corresponde a la absorción de DOPA [51, 52] y el hombro en 350 nm se relaciona a la presencia de quinonas, producto de la oxidación de la DOPA [53].

Sin embargo, el lote I presenta un leve hombro alrededor de los 580 nm, que podría sugerir la presencia de CuNp de mayor tamaño. En la Figura 4.36 se muestran micrografías de los tres lotes. Efectivamente, las partículas del lote I resultaron más grandes, aproximadamente de 10 nm, mientras que las de los lotes II y III manifiestan partículas muy pequeñas, de 2,7 y 2,9 nm de diámetro promedio, respectivamente. Esto concuerda el análisis de otros autores que afirman que suspensiones de nanopartículas muy pequeñas (menores a 5 nm) no presentan SPR definida [1, 14].



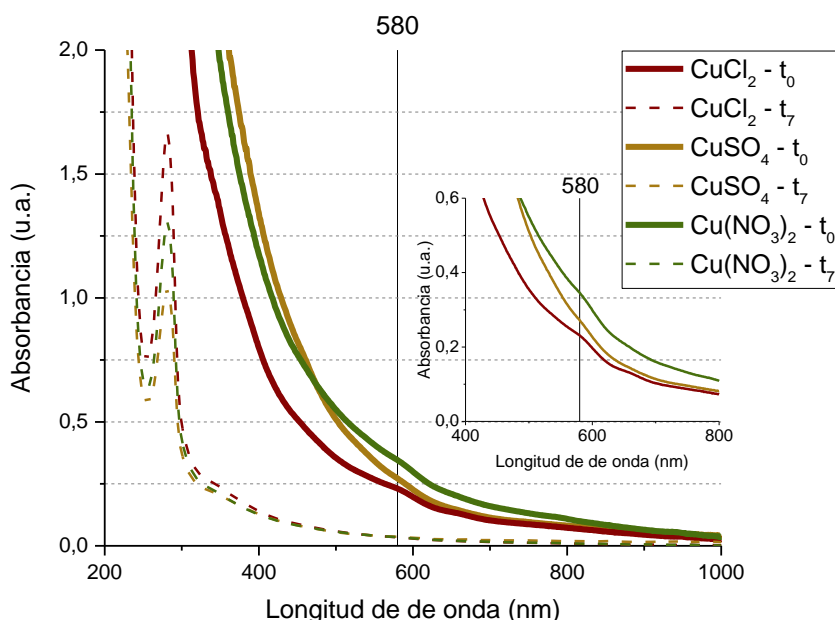
**Figura 4.36. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: DOPA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ . Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de agitación: 6h. Comparación de tamaños de diferentes lotes de CuNp. Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de partículas.**

#### 4.4.1.1. Modificaciones a partir del protocolo de referencia

Para lograr un efecto prolongado de la actividad bactericida a través de una liberación controlada de iones  $\text{Cu}^{2+}$  es necesario obtener CuNp con mayores tamaños que las sintetizadas por Xiong y col. [50]. Por lo tanto se propusieron algunas modificaciones tendientes a lograr CuNp con mayor tamaño nanométrico:

- **Precursores.** Se evaluaron, además de  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{CuSO}_4$ , conservando las demás condiciones según el protocolo original.
- **Temperatura de reacción:** 90 y 100°C.
- **Tiempo de reacción:** 5 – 10 - 15 y 30 min, empleando  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ .

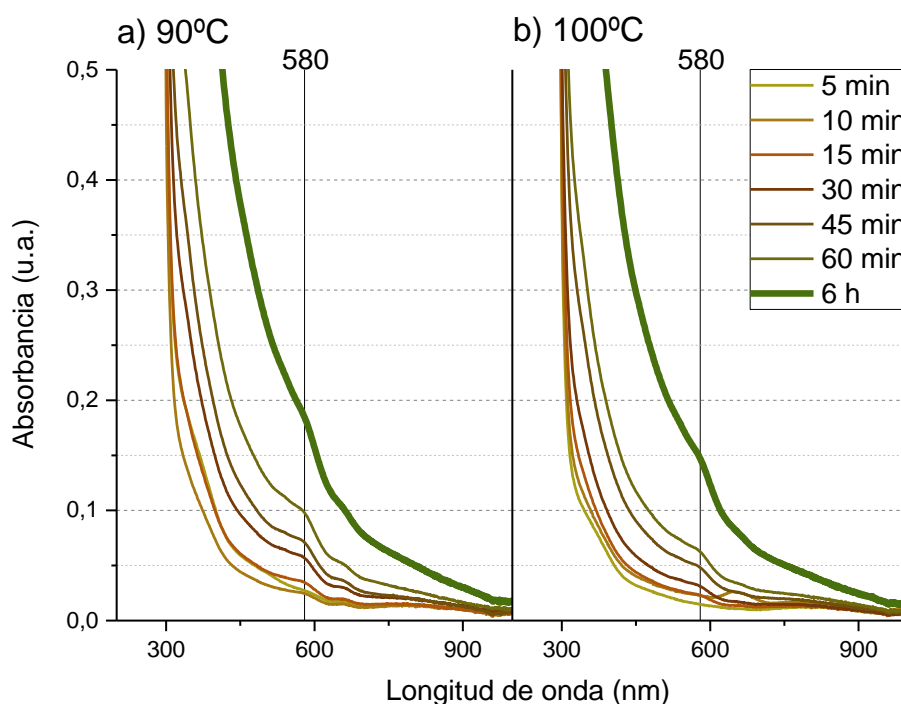
Al evaluar los tres precursores no se observaron diferencias importantes. En los tres casos se detecta un pequeño hombro alrededor de 580 nm el día de la preparación ( $t_0$ ) de las suspensiones, el cual desaparece a los 7 días ( $t_7$ ) y sólo se observa el pico de absorbancia correspondiente a la DOPA en 280 nm (Figura 4.37). Por lo tanto, con los tres precursores se obtuvieron CuNp pero al cabo de  $t_7$  se habrían disuelto, sugerido por la disminución de la intensidad de la absorbancia entre 500 y 600 nm.



**Figura 4.37. CuNp sintetizadas en sistema discontinuo. Reductor: DOPA. Temperatura 80°C. Tiempo de agitación: 6h. Comparación de espectros UV-vis empleando diferentes precursores:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{CuSO}_4$  Tiempos de análisis: día de síntesis ( $t_0$ ) y 7 días ( $t_7$ ).**



La Figura 4.38 muestra la evolución del SPR de CuNp obtenidas con  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  con tiempos de agitación, a 90 y 100°C. A diferencia de la  $\text{N}_2\text{H}_4$ , un tiempo de reacción prolongado generó un aumento en la intensidad de la absorbancia alrededor de 580 nm, indicando un incremento de la concentración de CuNp. La DOPA es un agente reductor más débil que la  $\text{N}_2\text{H}_4$ , por lo que un mayor tiempo de reacción favorece el contacto entre los reactivos. En cambio, al comparar los espectros de las Figuras 4.37, 4.38-a y 4.38-b el aumento de la temperatura generó una leve disminución de la absorbancia en 580 nm. La dopamina es un compuesto sensible a la luz y la temperatura [54], por lo tanto el incremento de la temperatura de reacción podría afectar su estabilidad, disminuyendo su poder reductor.

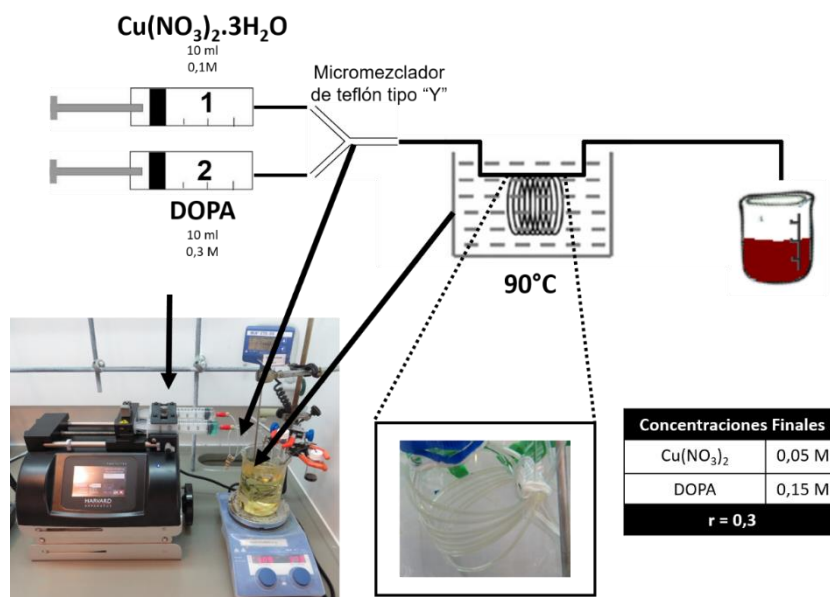


**Figura 4.38. CuNp sintetizadas en sistema discontinuo. Reductor: DOPA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ .** Comparación de espectros UV-vis de CuNp sintetizadas a diferentes temperaturas: a) 90°C y b) 100°C. Tiempo de reacción: 5, 10, 15, 30, 45, 60 min y 6h.

#### 4.4.2. Síntesis en sistema continuo

La síntesis en continuo se llevó a cabo empleando micromezclador de teflón tipo “Y” (Figura 4.39). Las soluciones acuosas de DOPA y  $\text{Cu}^{2+}$  se incorporaron por separado (jeringa 1 y 2, respectivamente). Para la selección de las condiciones de reacción se tuvo en cuenta que, aunque con 6 h se obtuvo mejor intensidad en los espectros UV-vis

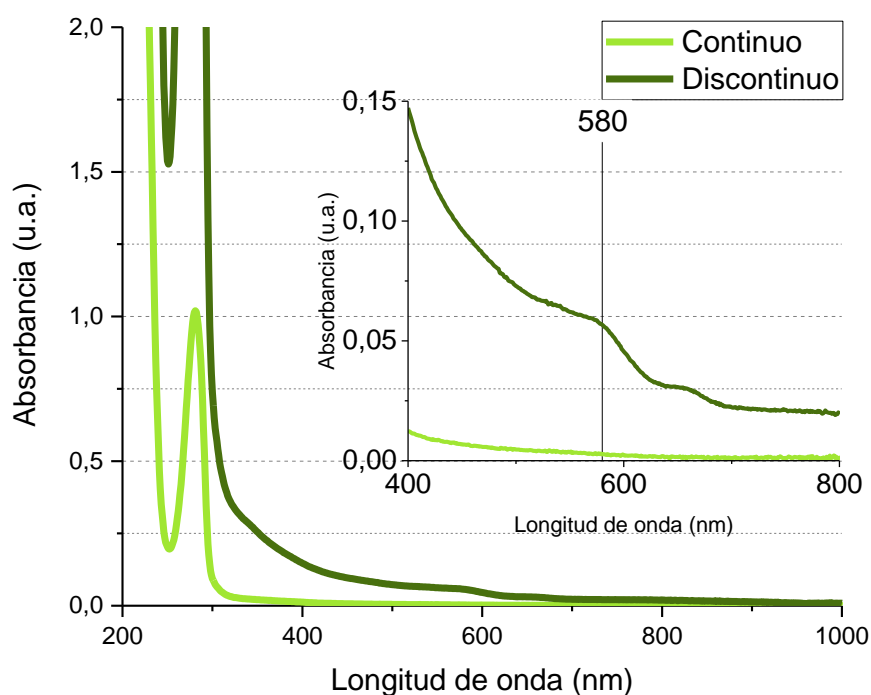
(Figura 4.38), es un tiempo de residencia muy prolongado para el sistema continuo. Por lo tanto, a partir de los resultados de la Figura 4.38 se seleccionaron como condiciones de reacción:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  como precursor, temperatura  $90^\circ\text{C}$  y 30 min de tiempo de residencia, como prueba preliminar.



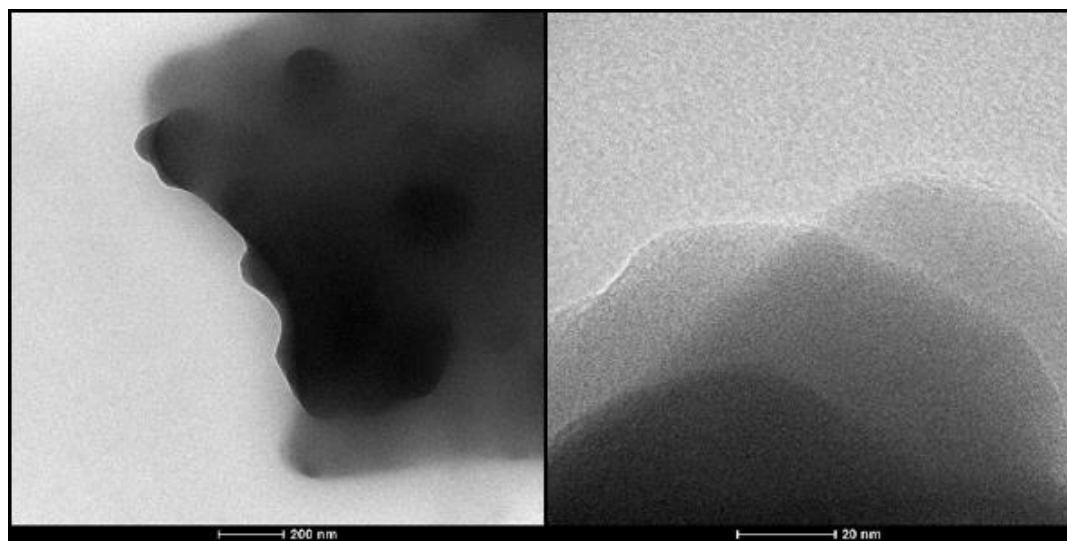
**Figura 4.39. Síntesis de CuNp en sistema continuo. Reductor: DOPA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Temperatura:  $90^\circ\text{C}$ . Tiempo de residencia: 30 min. Esquema de síntesis en continuo empleando micromezclador de teflón tipo "Y". La tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.**

En la figura 4.40 se muestran los espectros UV-vis de las suspensiones obtenidas en iguales condiciones mediante sistema discontinuo y continuo. Con el régimen continuo no se observó la presencia del hombro alrededor de 580 nm, tal como se observa en el caso del discontinuo, tampoco se observan nanopartículas mediante TEM (Figura 4.41).

Debido a las características de los microrreactores, la distribución de la temperatura es más homogénea que en los sistemas discontinuos. Esto habría provocado una rápida inactivación de la DOPA, impidiendo la reducción de los iones de  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 4.40.** Síntesis de CuNp en sistema continuo. Reductor: DOPA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Temperatura:  $90^\circ\text{C}$ . Tiempo de residencia: 30 min. Comparación de espectros UV-vis de CuNp sintetizadas en sistemas discontinuo y continuo.



**Figura 4.41.** Síntesis de CuNp en sistema continuo. Reductor: DOPA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ . Temperatura:  $90^\circ\text{C}$ . Tiempo de residencia: 30 min. Imágenes TEM de síntesis de CuNp.

### 4.4.3. Conclusiones parciales

Con el objetivo de obtener CuNp mediante protocolos compatibles con el ambiente, se propuso un protocolo en medio acuoso con DOPA como agente reductor y estabilizante. En primera instancia se evaluó la síntesis en régimen discontinuo estudiando la influencia del tipo de precursor, la temperatura y el tiempo de reacción.

Mediante sistema discontinuo se obtuvieron partículas muy pequeñas ( $< 5$  nm), motivo por el cual no se manifiesta la señal de SPR característica de las CuNp. El tipo de precursor utilizado no significó una influencia importante sobre las características de las CuNp obtenidas. En cambio el tiempo de agitación favorecería el contacto entre los reactivos generando un leve aumento en la concentración partículas. Por último se concluyó que un incremento de la temperatura afecta la estabilidad de la DOPA y por lo cual conduce a una disminución de su capacidad reductora.

Por último, por este motivo no fue posible la obtención de CuNp a través del sistema continuo. La distribución más homogénea de la temperatura en el interior de los microreactores provocaría la inactivación térmica de la DOPA, impidiendo la reducción de los iones de Cu.

## 4.5. Reductor ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) también es un compuesto compatible con el ambiente y con potenciales propiedades reductoras y estabilizantes. Por lo tanto, se adoptó un protocolo de referencia para evaluar la síntesis en sistema discontinuo estudiando diferentes variables.

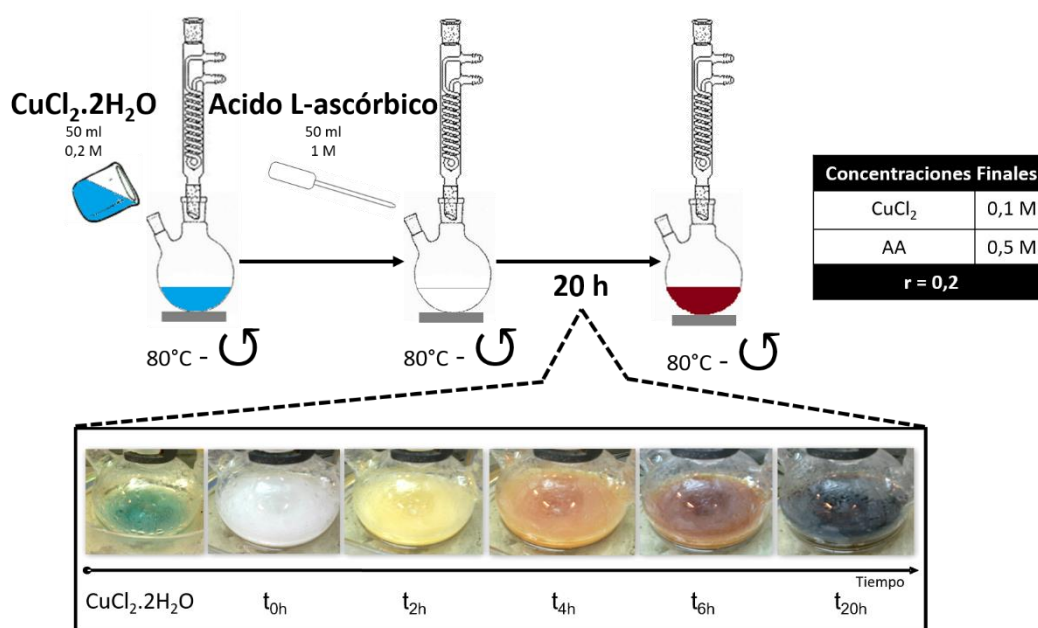
### 4.5.1. Síntesis en sistema discontinuo

Xiong y col. [55] propusieron la producción de CuNp utilizando AA como agente reductor y protector. En su trabajo informan que logran partículas estables durante dos meses con tamaños entre 1,8 y 1,3 nm, conforme la concentración de AA aumenta de 0,4 a 1 M.

#### 4.5.1.1. Síntesis a partir del protocolo de referencia

Tomando este trabajo como referencia, se prepararon 50 ml de dos soluciones acuosas, una de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 M y de AA 0,1 M (relación molar Cu/AA  $r = 0,2$ ). Primero se colocó

la solución de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $80^\circ\text{C}$  bajo agitación y luego se añadió gota a gota la solución de AA (Figura 4.42). Se mantuvo la disolución con agitación constante y reflujo en baño de aceite a  $80^\circ\text{C}$ . Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción y cada una se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. En la Figura 4.42 se muestra la evolución de color durante la reacción. Primero, la disolución es de color turquesa típico de la solución acuosa de Cu ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Al añadir el reductor la solución se torna blanca ( $t_{0h}$ ); luego de 2 h pasa a amarilla ( $t_{2h}$ ) y finalmente, luego de 20 h la suspensión se coloreó marrón oscura ( $t_{20h}$ ).

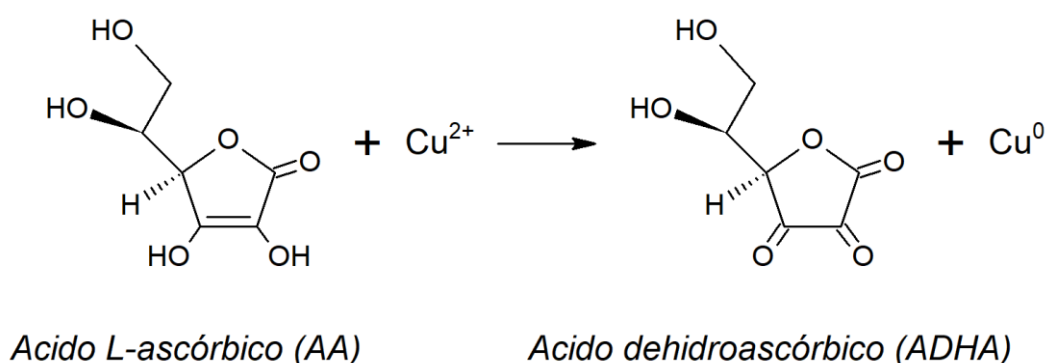


**Figura 4.42. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ .  $r$ : 0,2. Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de reacción: 20 h.** Esquema adaptado al sugerido por Xiong et al. [55]. Fotografías digitales muestran la evolución de color de la disolución en el tiempo. La tabla indica las concentraciones finales de los reactivos.

La transición de color observada coincidió con lo observado por Xiong y col. [55]. Sin embargo, en ninguno de los dos casos el color final coincide con el color rojo vino característico de las suspensiones de CuNp con un espectro de absorción máxima entre 560-600 nm [1-4, 17, 56, 57].

Los espectros UV-vis reportados por Xiong y col. [55] no presentan ningún pico alrededor de 570 nm que revele la presencia de CuNp. Sin embargo, observaron un amplio pico en 330 nm a partir de las 2 h y otro alrededor de 450 nm, el cual incrementó su intensidad y sufrió un corrimiento hacia mayores longitudes de ondas (550 nm). Los autores

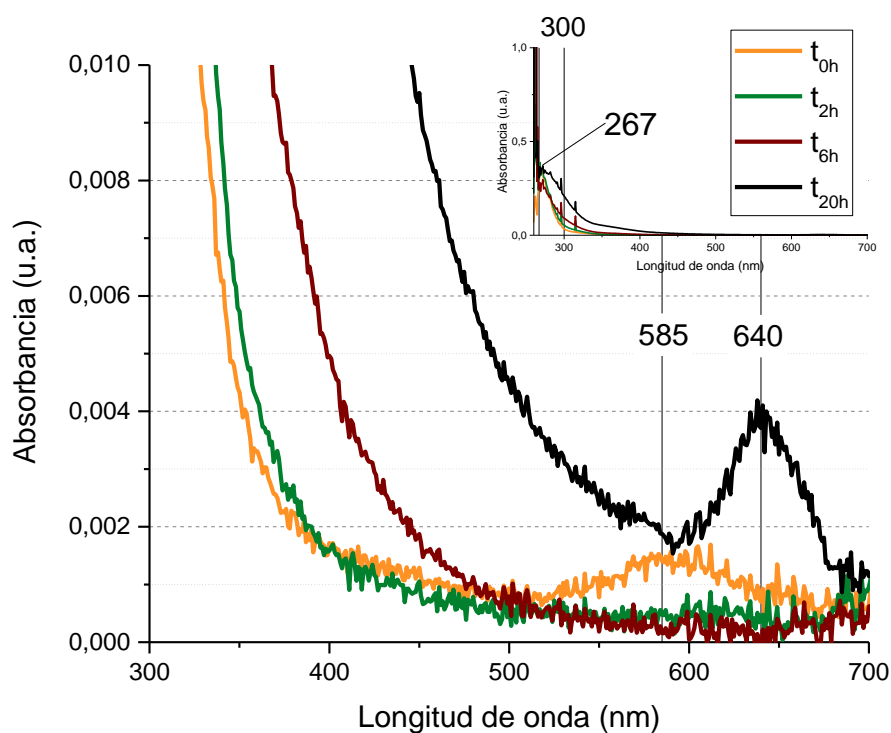
asociaron el pico en 330 nm a la absorción del producto oxidado del AA, el ácido dehidroascórbico (ADHA) (Figura 4.43). Y que la ausencia del SPR en 570 nm se debe a que las CuNp presentaron un tamaño menor a 4 nm. De acuerdo a los análisis de TEM el tamaño medio de partículas fue alrededor de 1,8 nm diámetro, resultando menores a mayor concentración de AA.



**Figura 4.43. Ácido ascórbico (AA) como agente reductor.** Ecuación de la reacción de reducción para la formación de las CuNp [55].

En la Figura 4.44 se presenta el espectro UV-vis de muestras tomadas en distintos tiempos de reacción:  $t_{0h}$  corresponde al momento en que se agregó el reductor,  $t_{2h}$ ,  $t_{6h}$  y  $t_{20h}$  a los distintos tiempos de residencia de 2, 6, y 20 h, respectivamente. A  $t_{0h}$  se observó un pico de muy baja intensidad en 585 nm, que desapareció luego de 2 h. A  $t_{6h}$  se observó un incremento en la intensidad entre 300 y 400 nm. Finalmente, a  $t_{20h}$  el pico con mayor longitud de onda se desplazó hacia 640 nm, mientras la intensidad a bajas longitudes continuó aumentando hasta evidenciarse un pico alrededor de 267 nm (gráfica ampliada en Figura 4.44). Los análisis de TEM (Figura 4.45) se reflejan que las CuNp a  $t_{20h}$  presentaron un diámetro promedio de  $3,3 \pm 0,9$  nm. Esto podría explicar la diferencia en el espectro UV-vis respecto del trabajo tomado como referencia. En nuestro caso las partículas resultaron un poco más grandes, si bien fueron menores a 5 nm, el histograma de la Figura 4.45 muestra la presencia de partículas de hasta 6,5 nm. El hecho de que hayan resultado más grandes explicaría la presencia del SPR a 585 a  $t_{0h}$ , que podrían haber continuado creciendo dando lugar al desplazamiento del pico hacia 640 nm en  $t_{20h}$ . Respecto a la absorbancia a menores longitudes, podrían ser el resultado de la combinación de la presencia de CuNp oxidadas y de la presencia de AA, en concordancia con lo reportado respecto a los productos de oxidación del AA que

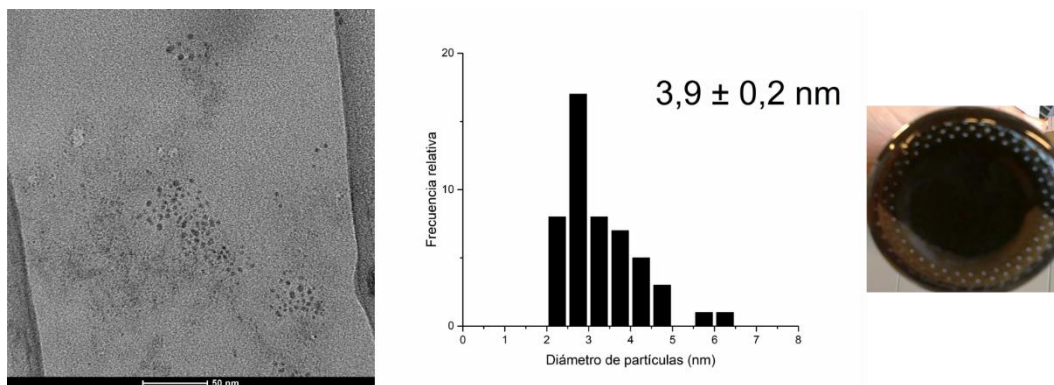
absorben en el rango 245-330 nm [58, 59]. El AA ascórbico en solución se oxida fácilmente a ADHA, el cual a su vez es muy inestable y se convierte en otros productos de degradación. El oxígeno disuelto y la temperatura favorecen la oxidación del AA a ADHA [60, 61]. Como control se llevó a cabo el protocolo de síntesis de la Figura 4.42 a 80°C pero sin el agregado del precursor de cobre para evaluar la absorción del AA y los productos de degradación. Luego de 20 h la solución adquirió un color naranja intenso presentando un pico en 267 nm en el espectro UV-vis. Podría esperarse que el color de la solución sea consecuencia del solapamiento de los colores marrón por la presencia de CuO [7] y naranja del AA oxidado.



**Figura 4.44. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor: CuCl<sub>2</sub>. r: 0,2. Temperatura: 80°C. Espectros de UV-Vis de las distintas alícuotas tomadas a lo largo de las 20 h de reacción. t<sub>0h</sub>, corresponde al momento en que se agregó el AA, t<sub>2h</sub>, t<sub>6h</sub> y t<sub>20h</sub> a las 2, 4, 6, 8 y 20 h, respectivamente.**

Por último, a partir de la fotografía digital de la Figura 4.45 se puede observar que la dispersión no resultó estable a lo largo del tiempo y que se formaron agregados al cabo de diez días.





**Figura 4.45. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ . r: 0,2. Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de reacción: 20 h. Micrografía de TEM de la suspensión de CuNp a  $t_{20h}$  y distribución de tamaños. La fotografía digital muestra el precipitado formado luego de 10 días de almacenamiento.**

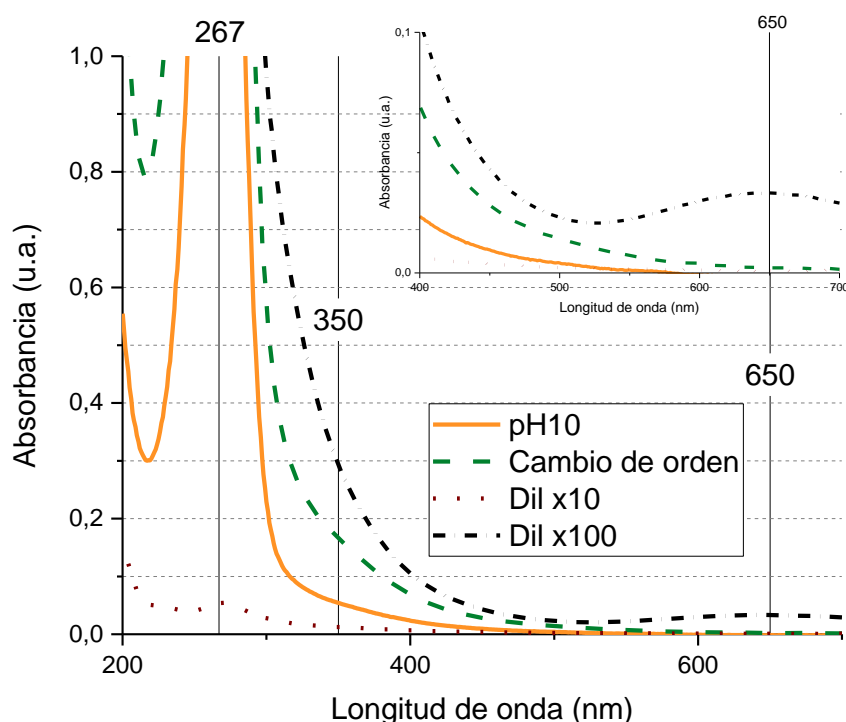
#### 4.5.1.2. Modificaciones a partir del protocolo de referencia

Debido a la falta de estabilidad coloidal, se llevaron a cabo algunas modificaciones del protocolo inicial. Evaluando los resultados y analizando el efecto de cada variable sobre la calidad de la suspensión, se planteó modificar el pH, el orden de agregado de reactivos y las concentraciones finales de reactivos.

- pH 10. Con una solución  $\text{NH}_4\text{OH}$  3 M se modificó el pH de la solución de  $\text{CuCl}_2$  pH = 3,6 a pH = 10
- Orden de adición de reactivos. Se alteró el orden de incorporación de reactivos, añadiendo primero el ácido L- ascórbico y luego la disolución de cobre, manteniendo el cambio de pH de esta última.
- Dilución x10 y x100. Se diluyeron las soluciones del reductor y el precursor de cobre 10 y 100 veces, manteniendo los cambios anteriores.

En la Figura 4.46 se muestran los espectros de absorción correspondientes a las diferentes síntesis, una vez transcurrido un tiempo de reacción de 20 h. No se observan cambios especialmente significativos respecto al protocolo original que indiquen la presencia de CuNp típicamente asociadas a máximos en torno a 560-600 nm. En todos los casos se observa un pico de absorción en torno a 267 nm, relacionado con el AA. A su vez, el cambio de orden de reactivos y la dilución a x100 provocaron un incremento en la absorción alrededor de 350 nm. Y solamente en el caso de la dilución x100 se observó un pico de absorción en 650 nm.



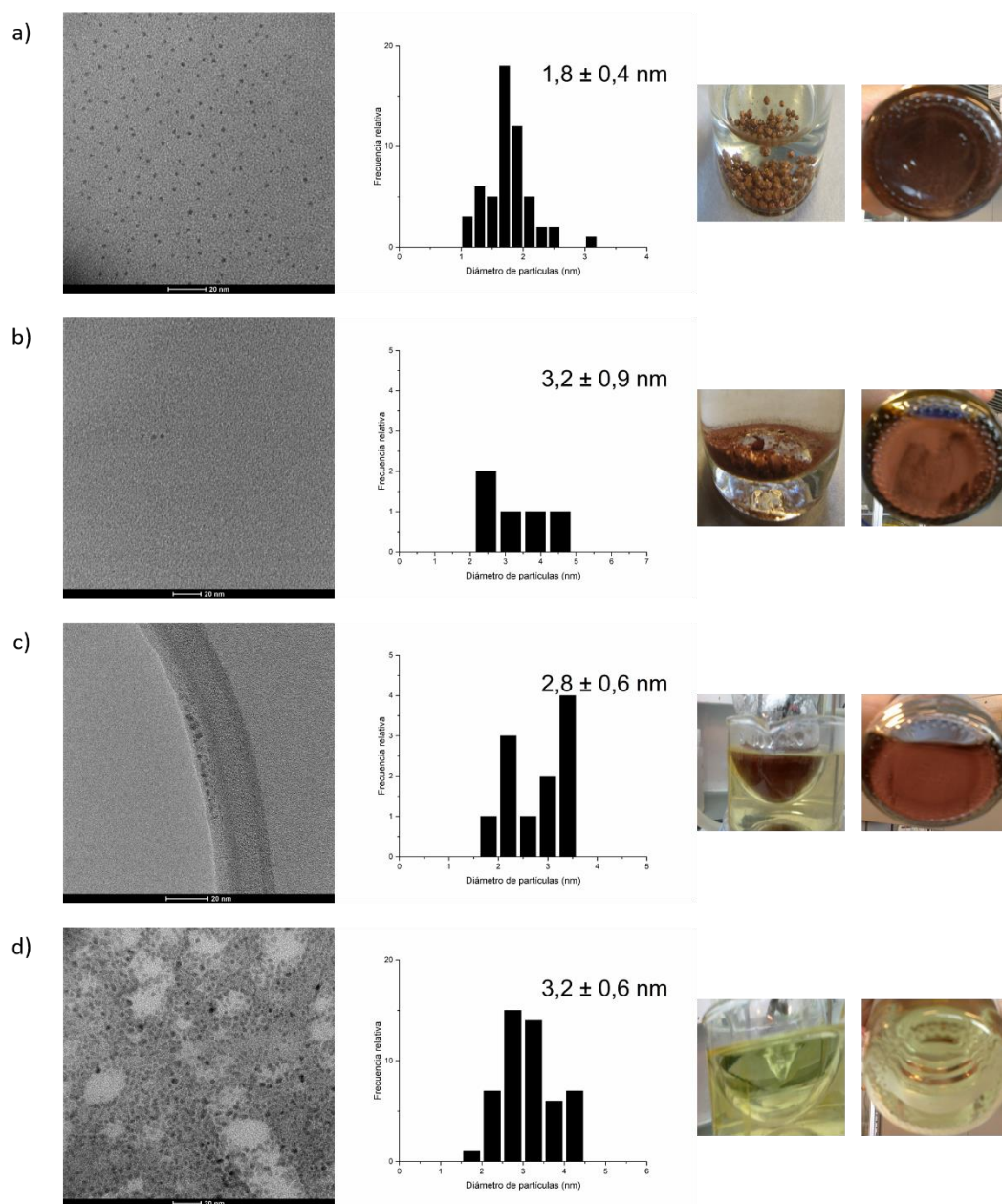


**Figura 4.46. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ . r: 0,2. Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de reacción: 20 h. Espectros UV-Vis correspondientes a las distintas variaciones experimentales a partir del protocolo de referencia, pH 10, cambio de orden, Dil x10 y Dil x100.**

Al analizar las imágenes de TEM de las partículas obtenidas a partir de los diferentes protocolos modificados (Figura 4.47) se determinó que la modificación de pH dio lugar a la formación de partículas de  $1,8 \pm 0,4$  nm, el cambio de orden de  $3,2 \pm 0,9$  nm, y las diluciones x10 y x100 de  $2,8 \pm 0,6$  nm y  $3,2 \pm 0,6$  nm, respectivamente. En todos los casos se obtuvieron partículas pequeñas, razón por la cual se explicaría la ausencia de SPR en la Figura 4.46.

En la Figura 4.47 se presentan las imágenes del aspecto de cada una de las suspensiones. Se destaca que con el cambio de pH = 10 e intercambio de orden (Figura 4.47-a y b), se obtuvo gran cantidad de precipitado de cobre metálico. Así mismo, el sobrenadante de estas muestras y el de la diluida x10 resultó marrón y luego de 10 días se formó precipitado. Por el contrario, la muestra preparada con concentraciones diluidas x100 mostró una disolución verde transparente y sin la presencia de precipitados a lo largo

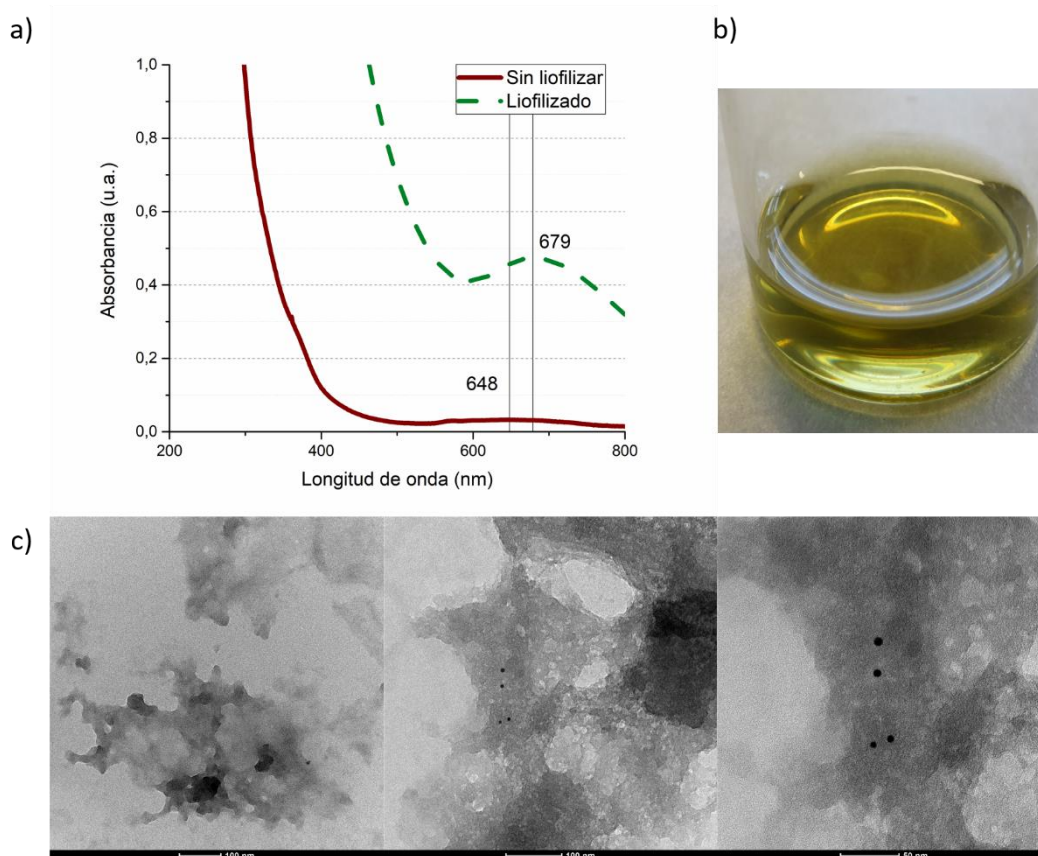
del tiempo (Figura 4.47-d) con un pico de absorbancia en 650 nm, relacionado con la oxidación de las CuNp [1].



**Figura 4.47. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ . r: 0,2. Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de reacción: 20 h. Imágenes de TEM y distribución de tamaños y aspecto de las CuNp a  $t_{0h}$  habiendo modificado: a) pH 10, b) Cambio de orden, c) Dil x10 y d) Dil x100, respecto del protocolo original**

A partir de estas observaciones respecto a la estabilidad de las suspensiones, se resolvió proseguir con el protocolo con mayor dilución. Luego, para llevar a cabo ensayos bactericidas la muestra se concentró mediante liofilización.

En la Figura 4.48-a se muestra el espectro de la dispersión antes y después de ser liofilizada. En la gráfica se puede ver que después de la liofilización el pico de absorbancia se desplaza hacia 679 nm. Este corrimiento hacia mayores longitudes de onda puede deberse a un incremento del grado de oxidación de las CuNp [1, 7, 9] o al aumento de tamaño de partículas o presencia de agregados [12]. Esto último, coincide con el análisis de TEM (Figura 4.48-b), donde se deduce que la liofilización y resuspensión posterior de las partículas afectó la morfología y la agregación de las mismas en suspensión.







**Figura 4.48. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{CuCl}_2$ . r: 0,2. Temperatura:  $80^\circ\text{C}$ . Tiempo de reacción: 20 h. Dilución  $\times 100$ .** a) Espectro UV-vis se suspensión original y concentrada por liofilización. b) Fotografía digital de la muestras resuspendida luego de la liofilización. c) Imágenes de TEM de la muestra liofilizada y resuspendida.

### 4.5.1.3. Evaluación de diferentes precursores

En vista a la dificultad de disminuir la formación de precipitado y del efecto contraproducente de la concentración por liofilización, se propuso estudiar modificar el precursor, ya que como se mencionó anteriormente, la naturaleza y concentración de estos influyen en el mecanismo de formación de las CuNp. En la síntesis con  $N_2H_4$  (Capítulo 4.3), la utilización de  $CuSO_4$  y  $CuCl_2$  dio lugar a la formación inmediata de precipitado, mientras que con  $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$  se logró generar una suspensión de partículas más estables. Por lo tanto, se evaluaron  $CuCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $Cu(NO_3)_2$  y  $Cu(CH_3COO)_2$ . La síntesis se desarrolló a temperatura ambiente mezclando soluciones 0,2 M de los distintos precursores con soluciones 0,4 M de AA ( $r = 0,5$ ). En la Tabla 4.4 se muestran los distintos experimentos indicando el pH de las soluciones de Cu antes ( $pH_i$ ) y después de mezclarlas con la solución AA 0,4 M de pH 2,25 ( $pH_f$ ); y además se muestra el aspecto de las suspensiones obtenidas en cada caso.

**Tabla 4.4. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA.  $r$ : 0,5. Temperatura: ambiente. Tiempo de reacción: 15 min.** Evaluación de diferentes precursores en  $r = 0,5$  a temperatura ambiente. Las fotografías se tomaron a los 5 min ( $t_{5 \text{ min}}$ ) de finalizado el tiempo de reacción.

Precursor [0,2 M]	$pH_i$	$pH_f$ (AA [0,4 M] – pH 2,25)	Color del precipitado	Color del sobrenadante	$t_{5 \text{ min}}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	3,4	1,3	Blanco	Transparente	
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	2,9	1,3	Rojo brillante	Verde	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	3,9	1,6	Rojo brillante	Verde	
$Cu(CH_3COO)_2$	5,2	3,1	Rojo ladrillo	Transparente	

De estos ensayos a temperatura ambiente se visibiliza que el  $CuCl_2$  da lugar a la formación de un precipitado blanco y un supernadante transparente, el  $Cu(NO_3)_2$  y el  $CuSO_4$  a un precipitado de cobre metálico y supernadante verdoso, mientras que el

$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  a una suspensión rojiza. A su vez el pH final fue 1,3 para el caso de  $\text{CuCl}_2$  y  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ , 1,6 para el  $\text{CuSO}_4$  y 3,1 para el  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .

El AA presenta mayor poder reductor entre pH 5 y 7 [5, 62, 63]. En el caso de la sal de  $\text{CuCl}_2$  el pH<sub>f</sub> resultó muy ácido (Tabla 4.4). Por lo tanto, a medida que el AA reduce el  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Cl}^-$  presente lo estabiliza en  $\text{Cu}^+$  formando  $\text{CuCl}$  (I), que es un precipitado insoluble [64]. Esto también se observó al reproducir el protocolo original (Figura 4.45), pero al realizarse a 80°C la oxidación del AA torna la solución de color oscuro y no se puede distinguir el color del precipitado. En los casos que se modificó a pH = 10 (Figura 4.47), donde el AA actúa mejor como reductor, se habría llegado a reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$  [5, 62] o bien el precipitado rojo se debe a la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , que es la forma estabilizada del  $\text{Cu}^+$  a pH superiores a 7 [64]. Esto indica que, en las síntesis con  $\text{CuCl}_2$  gran parte del Cu precipitó como  $\text{CuCl}$  (I) o  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Por otro lado, los precursores  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{CuSO}_4$  también dieron lugar a un pH<sub>f</sub> bajo (Tabla 4.4), sin embargo el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{SO}_4^{2-}$  no forman sales de Cu insolubles. Por lo tanto, si bien el AA actúa mejor como reductor a pH superiores (pH = 5-7), el  $\text{Cu}^{2+}$  habría llegado a reducirse dando lugar a partículas de  $\text{Cu}^0$  muy grandes que precipitaron, lo cual coincide con el color rojo brillante del precipitado, indicando la presencia de  $\text{Cu}^0$ . No se formó  $\text{Cu}_2\text{O}$  por la acidez del medio [62]. Respecto al color verde del sobrenadante, podría deberse a la oxidación de las CuNp en suspensión [1].

En cambio, con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  el pH<sub>f</sub> = 3,1 (Tabla 4.4), fue levemente más alto y dio lugar a la formación de partículas de menor tamaño, permaneciendo más tiempo en suspensión. A los 5 min, finalizado el tiempo de reacción ( $t_{15 \text{ min}}$ ), se generó un precipitado color rojo, indicando la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , lo que se explica por el pH moderadamente ácido [64].

Debido a que el poder reductor del AA se favorece por pH levemente ácidos y con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  se formaron partículas de menor tamaño que con  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y con  $\text{CuSO}_4$ , se continuó trabajando con el  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  como sal precursora.

### 4.5.2. Conclusiones parciales

Como segunda alternativa compatible con la química verde, se propuso la síntesis de CuNp utilizando AA como agente reductor y estabilizante en medio acuoso. Con el objetivo de aumentar el tamaño medio de las CuNp y mejorar la estabilidad coloidal se evaluaron diferentes condiciones: pH, orden de incorporación de reactivos, diluciones y tipo de precursores.

De estas variables, se concluyó que el tipo de precursor es la más influyente y que a su vez afecta al pH final de las soluciones. De esta manera, empleando  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  la solución alcanza un pH moderadamente ácido que favorece la reacción de reducción logrando la formación de CuNp. Sin embargo, las partículas obtenidas precipitan al poco tiempo, lo que imposibilita la evaluación de la síntesis mediante sistema continuo.

Por lo tanto, a partir de estos resultados, se estableció que el  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  es un buen candidato para optimizar el protocolo mediante la aplicación de un diseño estadístico de experimentos y elegir las condiciones para evaluar la síntesis en continuo.

## 4.6. Bibliografía

1. Rice, K.P., Walker, E.J., Stoykovich, M.P., Saunders, A.E., *Solvent-Dependent Surface Plasmon Response and Oxidation of Copper Nanocrystals*. The Journal of Physical Chemistry C, **2011**. 115 (5): p. 1793.
2. Zhang, H.-X., Siegert, U., Liu, R., Cai, W.-B., *Facile fabrication of ultrafine copper nanoparticles in organic solvent*. Nanoscale Research Letters, **2009**. 4 (7): p. 705.
3. Tokarek, K., Hueso, J.L., Kuśtrowski, P., Stochel, G., Kyzioł, A., *Green synthesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles*. European Journal of Inorganic Chemistry, **2013**. 2013 (28): p. 4940.
4. Gurav, P., Naik, S.S., Ansari, K., Srinath, S., Kishore, K.A., Setty, Y.P., Sonawane, S., *Stable colloidal copper nanoparticles for a nanofluid: Production and application*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2014**. 441: p. 589.
5. Biçer, M., Şişman, İ., *Controlled synthesis of copper nano/microstructures using ascorbic acid in aqueous CTAB solution*. Powder Technology, **2010**. 198 (2): p. 279.
6. Andal, V., Buvaneswari, G., *Effect of reducing agents in the conversion of Cu<sub>2</sub>O nanocolloid to Cu nanocolloid*. Engineering Science and Technology, an International Journal, **2017**. 20 (1): p. 340.
7. Pedersen, D.B., Wang, S., Liang, S.H., *Charge-transfer-driven diffusion processes in Cu@Cu-oxide core-shell nanoparticles: Oxidation of 3.0 ± 0.3 nm diameter copper nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, **2008**. 112 (24): p. 8819.
8. Morioka, T., Takesue, M., Hayashi, H., Watanabe, M., Smith, R.L., *Antioxidation properties and surface interactions of polyvinylpyrrolidone-capped zerovalent copper nanoparticles synthesized in supercritical water*. ACS Applied Materials & Interfaces, **2016**. 8 (3): p. 1627.
9. Shi, M., Kwon, H.S., Peng, Z., Elder, A., Yang, H., *Effects of surface chemistry on the generation of reactive oxygen species by copper nanoparticles*. ACS Nano, **2012**. 6 (3): p. 2157.
10. Dang, T.M.D., Le, T.T.T., Fribourg-Blanc, E., Dang, M.C., *The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2011**. 2 (2): p. 025004.
11. Zain, N.M., Stapley, A.G., Shama, G., *Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications*. Carbohydrate Polymers, **2014**. 112: p. 195.
12. Begletsova, N., Selifonova, E., Chumakov, A., Al-Alwani, A., Zakharevich, A., Chernova, R., Glukhovskoy, E., *Chemical synthesis of copper nanoparticles in aqueous solutions in the presence of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2018**. 552: p. 75.



13. Komeily-Nia, Z., Montazer, M., Latifi, M., *Synthesis of nano copper/nylon composite using ascorbic acid and CTAB*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2013**. 439: p. 167.
14. Brumbaugh, A.D., Cohen, K.A., St. Angelo, S.K., *Ultrasmall copper nanoparticles synthesized with a plant tea reducing agent*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, **2014**. 2 (8): p. 1933.
15. Khanehzaei, H., Ahmad, M.B., Shameli, K., Ajdari, Z., *Synthesis and characterization of Cu@Cu<sub>2</sub>O core shell nanoparticles prepared in seaweed Kappaphycus alvarezii media*. International Journal of Electrochemical Science, **2014**. 9: p. 8189.
16. Hassan, M.S., Amna, T., Yang, O.B., El-Newehy, M.H., Al-Deyab, S.S., Khil, M.-S., *Smart copper oxide nanocrystals: Synthesis, characterization, electrochemical and potent antibacterial activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2012**. 97 (0): p. 201.
17. Salavati-Niasari, M., Davar, F., *Synthesis of copper and copper(I) oxide nanoparticles by thermal decomposition of a new precursor*. Materials Letters, **2009**. 63 (3): p. 441.
18. Zhang, W., Luan, C., Yang, Z., Liu, X., Zhang, D., Yang, S., *Preparation and optical properties of Cu<sub>2</sub>O hollow microsphere film and hollow nanosphere powder via a simple liquid reduction approach*. Applied Surface Science, **2007**. 253 (14): p. 6063.
19. Lisiecki, I., Billoudet, F., Pileni, M.P., *Control of the Shape and the Size of Copper Metallic Particles*. The Journal of Physical Chemistry, **1996**. 100 (10): p. 4160.
20. Pacioni, N.L., Pardoe, A., McGilvray, K.L., Chrétien, M.N., Scaiano, J.C., *Synthesis of copper nanoparticles mediated by photogenerated free radicals: catalytic role of chloride anions*. Photochemical & Photobiological Sciences, **2010**. 9 (6): p. 766.
21. Tang, X.-F., Yang, Z.-G., Wang, W.-J., *A simple way of preparing high-concentration and high-purity nano copper colloid for conductive ink in inkjet printing technology*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**. 360 (1): p. 99.
22. Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L., O'Connor, C.J., *Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles*. Chemical Reviews, **2004**. 104 (9): p. 3893.
23. Uykun, N., Ergal, İ., Kurt, H., Gökçeören, A.T., Göcek, İ., Kayaoğlu, B.K., Akarsubaşı, A.T., Sarac, A.S., *Electrospun antibacterial nanofibrous polyvinylpyrrolidone/cetyltrimethylammonium bromide membranes for biomedical applications*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, **2014**. 29 (4): p. 382.
24. Giorello, A., Gioria, E., Hueso, J.L., Sebastian, V., Arruebo, M., Veaute, C., Gutierrez, L., *Natural polysaccharides and microfluidics: A win-win combination towards the green and continuous production of long-term stable silver nanoparticles*. Journal of Environmental Chemical Engineering, **2018**. 6 (4): p. 5069.



25. Abdelhalim, M.A., Mady, M., Ghannam, M., *Physical properties of different gold nanoparticles: Ultraviolet-visible and fluorescence measurements*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, **2012**. 3 (3): p. 1.
26. Zuber, A., Purdey, M., Schartner, E., Forbes, C., van der Hoek, B., Giles, D., Abell, A., Monro, T., Ebendorff-Heidepriem, H., *Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2016**. 227: p. 117.
27. Gutierrez, L., Gomez, L., Irusta, S., Arruebo, M., Santamaria, J., *Comparative study of the synthesis of silica nanoparticles in micromixer-microreactor and batch reactor systems*. Chemical Engineering Journal, **2011**. 171 (2): p. 674.
28. Gomez, L., Arruebo, M., Sebastian, V., Gutierrez, L., Santamaria, J., *Facile synthesis of SiO<sub>2</sub>-Au nanoshells in a three-stage microfluidic system*. Journal of Materials Chemistry, **2012**. 22 (40): p. 21420.
29. Ortiz de Solorzano, I., Uson, L., Larrea, A., Miana, M., Sebastian, V., Arruebo, M., *Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: effect of passive mixing*. International Journal of Nanomedicine, **2016**. 11: p. 3397.
30. Chen, L., Zhang, D., Chen, J., Zhou, H., Wan, H., *The use of CTAB to control the size of copper nanoparticles and the concentration of alkylthiols on their surfaces*. Materials Science and Engineering: A, **2006**. 415 (1): p. 156.
31. Schachter, D., *The source of toxicity in CTAB and CTAB-stabilized gold nanorods*. Masters Abstracts International, **2013**. 51-05.: p. 71.
32. Aiello, C., Andreozzi, P., La Mesa, C., Risuleo, G., *Biological activity of SDS-CTAB cat-anionic vesicles in cultured cells and assessment of their cytotoxicity ending in apoptosis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2010**. 78 (2): p. 149.
33. Kalbáčová, M., Verdánová, M., Mravec, F., Halasová, T., Pekař, M., *Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2014** (0).
34. Singh, M., Sinha, I., Premkumar, M., Singh, A.K., Mandal, R.K., *Structural and surface plasmon behavior of Cu nanoparticles using different stabilizers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2010**. 359 (1-3): p. 88.
35. Cornei, N., Feraru, S., Bulimestru, I., Sandu Andrei, V., Mita, C., *Influence of type of precursors on the sol-gel synthesis of the LaCoO<sub>3</sub> nanoparticles*. Acta Chemica Iasi, **2014**. 22 (1): p. 1.
36. Vega-Chacón, J., Picasso, G., Avilés-Félix, L., Jafelicci, M., *Influence of synthesis experimental parameters on the formation of magnetite nanoparticles prepared by polyol method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2016**. 7 (1): p. 015014.

37. Hu, C., Li, P., Zhang, W., Che, Y., Sun, Y., Chi, F., Ran, S., Liu, X., Lv, Y., *Effect of cupric salts ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) on  $\text{Cu}_2(\text{OH})\text{PO}_4$  morphology for photocatalytic degradation of 2,4-dichlorophenol under Near-infrared light irradiation*. Materials Research, **2017**. 20: p. 407.
38. LaMer, V.K., Dinegar, R.H., *Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols*. Journal of the American Chemical Society, **1950**. 72 (11): p. 4847.
39. Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K.J., Nair, B.U., *Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates*. Bulletin of Materials Science, **2008**. 31 (1): p. 93.
40. Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K., *Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy*. Journal of Controlled Release, **2004**. 95 (2): p. 217.
41. Miguel García, I., *Nanopartículas de Pd para su aplicación en catálisis y en sistemas de detección de  $\text{H}_2$* . Tesis Doctoral. **2013**. Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alicante.
42. C. Anderson, C., R. Rodriguez, F., A. Thurston, D., *Crosslinking aqueous poly(vinyl pyrrolidone) solutions by persulfate*. Vol. 23. **1979**. 2453.
43. Garstecki, P., Fuerstman, M.J., Stone, H.A., Whitesides, G.M., *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up*. Lab on a Chip, **2006**. 6 (3): p. 437.
44. Zhang, J., Coulston, R.J., Jones, S.T., Geng, J., Scherman, O.A., Abell, C., *One-step fabrication of supramolecular microcapsules from microfluidic droplets*. Science, **2012**. 335 (6069): p. 690.
45. Wang, X., Riaud, A., Wang, K., Luo, G., *Pressure drop-based determination of dynamic interfacial tension of droplet generation process in T-junction microchannel*. Microfluidics and Nanofluidics, **2015**. 18 (3): p. 503.
46. Dreyfus, R., Tabeling, P., Willaime, H., *Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*. Physical Review Letters, **2003**. 90 (14): p. 144505.
47. Chen, J.P., Lim, L.L., *Key factors in chemical reduction by hydrazine for recovery of precious metals*. Chemosphere, **2002**. 49 (4): p. 363.
48. PubChem compound database. 1988 [Último acceso: **2018**]; Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/681>.
49. Ma, Y., Niu, H., Zhang, X., Cai, Y., *One-step synthesis of silver/dopamine nanoparticles and visual detection of melamine in raw milk*. Analyst, **2011**. 136 (20): p. 4192.

50. Xiong, J., Wu, X.-d., Xue, Q.-j., *Biomolecule-assisted synthesis of highly stable dispersions of water-soluble copper nanoparticles*. Journal of Colloid and Interface Science, **2013**. 390 (1): p. 41.
51. Ball, V., Gracio, J., Vila, M., Singh, M.K., Metz-Boutigue, M.-H., Michel, M., Bour, J., Toniazio, V., Ruch, D., Buehler, M.J., *Comparison of Synthetic Dopamine–Eumelanin Formed in the Presence of Oxygen and Cu<sup>2+</sup> Cations as Oxidants*. Langmuir, **2013**. 29 (41): p. 12754.
52. Verastegui-Omaña, B., Palomar-Pardavé, M., Rojas-Hernández, A., Corona Avendaño, S., Romero-Romo, M., Ramírez-Silva, M.T., *Spectrophotometric Quantification of the Thermodynamic Constants of the Complexes Formed by Dopamine and Cu(II) in Aqueous Media*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, (0).
53. Wei, Q., Zhang, F., Li, J., Li, B., Zhao, C., *Oxidant-induced dopamine polymerization for multifunctional coatings*. Polymer Chemistry, **2010**. 1 (9): p. 1430.
54. Plumb, D.C., *Dopamine*. Plumb's veterinary drug handbook. **2008**, PharmaVet Inc: United States.
55. Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., Wu, X., *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid*. Green Chemistry, **2011**. 13 (4): p. 900.
56. Thi My Dung, D., Thi Thu Tuyet, L., Eric, F.-B., Mau Chien, D., *The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2011**. 2 (2): p. 025004.
57. Thi My Dung, D., Thi Tuyet Thu, L., Eric, F.-B., Mau Chien, D., *Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2011**. 2 (1): p. 015009.
58. Zhang, Y., Zhu, P., Li, G., Zhao, T., Fu, X., Sun, R., Zhou, F., Wong, C.-p., *Facile preparation of monodisperse, impurity-free, and antioxidation copper nanoparticles on a large scale for application in conductive ink*. ACS Applied Materials & Interfaces, **2014**. 6 (1): p. 560.
59. Chang, S.K., Ismail, A., Daud, Z.A.M., *Ascorbic acid: Properties, determination and uses*. Encyclopedia of Food and Health, Editores: B. Caballero, P.M. Finglas, y F. Toldrá. **2016**, Academic Press: Oxford. p. 275.
60. Yuan, J.-P., Chen, F., *Degradation of ascorbic acid in aqueous solution*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1998**. 46 (12): p. 5078.
61. Sheraz, M., Khan, M., Ahmed, S., Hafeez Kazi, S., Ahmed, I., *Stability and stabilization of ascorbic acid*. Household and Personal Care Today, **2015**. 10: p. 20.

62. Wu, S., *Preparation of fine copper powder using ascorbic acid as reducing agent and its application in MLCC*. Materials Letters, **2007**. 61 (4): p. 1125.
63. Moshalagae Motlatle, A., Kesavan Pillai, S., Rudolf Scriba, M., Sinha Ray, S., *Chemical synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial properties of Cu and its oxide nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, **2016**. 18 (10): p. 312.
64. Burriel Marti, F., Lucena Conde, F., Arribas Jimeno, S., Hernandez Medez, J., *Química analítica cualitativa*. 16° ed. **1974**.

## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



## Capítulo 5 : Diseño experimental

---

Hasta el momento se estudiaron cambios puntuales en el protocolo de la síntesis de CuNp empleando ácido L-ascórbico como agente reductor y se observó que el tipo de precursor influye en las características de la solución obtenida. Sin embargo, no se logró obtener una suspensión estable de CuNp metálicas.

Por lo tanto, en este capítulo, se propone acotar la variabilidad del sistema planteando el uso de un diseño experimental para determinar los factores más influyentes en la síntesis de CuNp. En una primera etapa, se aplica el diseño seleccionado a la síntesis en sistema discontinuo empleando ácido L-ascórbico (AA) como reductor,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  como precursor y polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizante. Con la información obtenida se llevó a cabo en una segunda etapa, la síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado y de fase continua.

### 5.1. Síntesis en sistema discontinuo

#### 5.1.1. Diseño factorial de nivel dos

El objetivo de un diseño experimental (DE) consiste en evaluar modificaciones en simultáneo de diferentes variables y determinar cuál de éstas ejerce mayor influencia sobre el objetivo. Dentro de los diferentes diseños experimentales, los diseños factoriales se utilizan principalmente para comprender si los factores son importantes sobre la respuesta evaluada y detectar cómo interactúan y afectan individualmente. Estos diseños se utilizan como punto de partida para luego desarrollar un modelado de superficies de respuesta más complejo que permite determinar las condiciones óptimas de los factores influyentes [1, 2].

De este modo se seleccionó un diseño factorial de nivel dos y con la información experimental obtenida hasta el momento y con el apoyo de la bibliografía se seleccionaron cuatro variables:

- Temperatura: El rango de temperatura usado en los protocolos reportados en la bibliografía para la síntesis de CuNp con AA se encuentra entre 25° y 90°C [3-7].

- Concentración de PVP: Se ha evidenciado que el aumento de la concentración del agente protector produce la disminución del tamaño de partícula [8]. Motlatle y col. [7] emplearon PVP al 3% p/v. De nuestra experiencia, pruebas con concentraciones de PVP ([PVP]) de 10%, 15% y 20 %p/v no distinguieron diferencias significativas en la estabilidad de las CuNp (Capítulo 4.3). En función de esto se establece un rango entre 1 y 15% p/v.
- Relación Cu/AA: Zain y col. [8] publicaron que el aumento de la relación Cu/AA incrementa el tamaño de partícula. Con el objetivo de disminuir el precipitado, se planteó evaluar dos relaciones,  $r = 0,01$  y  $0,1$ , manteniendo fija la concentración de cobre en  $0,01\text{M}$  y variando la concentración de AA ([AA]) entre  $1$  y  $0,1\text{ M}$ .
- pH: Motlatle y col. [7] observaron que el pH influye tanto en el tamaño como en la reducción del cobre. Un aumento de pH conduce a una disminución de tamaño, ya que mejora la acción del PVP. Mientras que cuando el pH es bajo no se produce reacción de reducción por la inestabilidad del AA. Es por esto que sugieren un óptimo alrededor de pH 7. De nuestros ensayos observamos que luego de la reacción entre  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y el AA el pH disminuye de  $5,2$  a  $3,1$  (Tabla 4.4). A partir de esta información se plantea modificar el pH de la solución del precursor de cobre y PVP entre  $3$  y  $7$ .

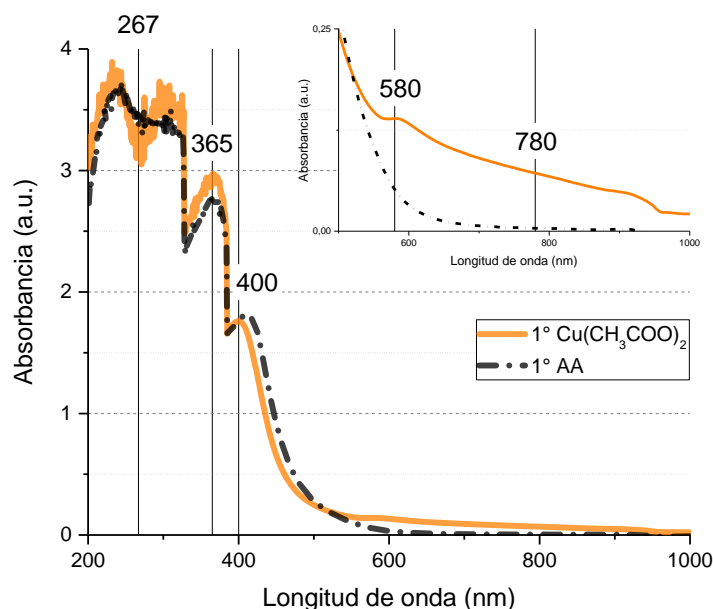
### 5.1.2. Influencia del orden de agregado de reactivos

Previo al desarrollo del DE se realizaron pruebas para evaluar el orden de agregado de reactivos. Para ello se llevaron a cabo dos síntesis empleando una  $r = 0,01$  con una [PVP] de  $15\%$  p/v a  $90^\circ\text{C}$  sin modificar el pH de la solución Cu/PVP, en un caso se incorporó primero la solución de AA y el otro la solución de Cu/PVP.

A partir de la Figura 5.1 se observa el espectro UV-vis de las muestras preparadas con los distintos órdenes de agregado de reactivos. En ambos casos se obtienen picos con longitudes de onda menores a  $500\text{ nm}$ . Estas absorbancias pueden deberse a los productos de oxidación del AA, que absorben en el rango  $245\text{-}330\text{ nm}$  [9, 10]. A su vez podrían indicar la formación de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , que se encuentran reportados picos de absorbancia en el rango  $230\text{-}500\text{ nm}$  (Figura 4.1) [11-17]. La presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$  coincide



con el análisis realizado en el capítulo 4.5, al emplear  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  en el estudio de los diferentes precursores (Tabla 4.4).



**Figura 5.1. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . [PVP]: 15%.  $r$ : 0,01. Temperatura ambiente. Tiempo de reacción: 4h. Comparación de espectros al cambiar el orden de agregado de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y AA.**

Sin embargo, solamente en el caso en el que se agregó primero el precursor de cobre se detectó el pico de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) alrededor de 580 nm, evidenciando la formación de CuNp. Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que al agregar primero el AA, este es llevado a temperatura un tiempo antes. Esto podría favorecer su oxidación a ácido dehidroascórbico (ADHA), ya que en solución, a temperatura y en presencia de oxígeno es muy inestable [18, 19]. En cambio, cuando se incorpora luego del precursor metálico, va reduciendo el Cu a medida que se agrega, dando lugar a la formación de CuNp. Cabe destacar que además de la señal de SPR alrededor de 580 nm, se observa una absorbancia residual a mayores longitudes que podría ser resultado de la presencia de partículas grandes y/o la oxidación superficial de las CuNp [8, 20-22].

Esto indica que, por un lado la influencia del orden de incorporación de reactivos y que efectivamente, un aumento de la [AA] generó una disminución de partículas debido a que la el SPR indica la presencia de CuNp en suspensión. Mediante DLS se determinó

que las CuNp tenían un diámetro hidrodinámico de  $421,4 \pm 2,6$  nm (IPD 0,3). Por lo tanto los ensayos del diseño experimental se desarrollaron incorporando primero el precursor de cobre y en segundo lugar el AA.

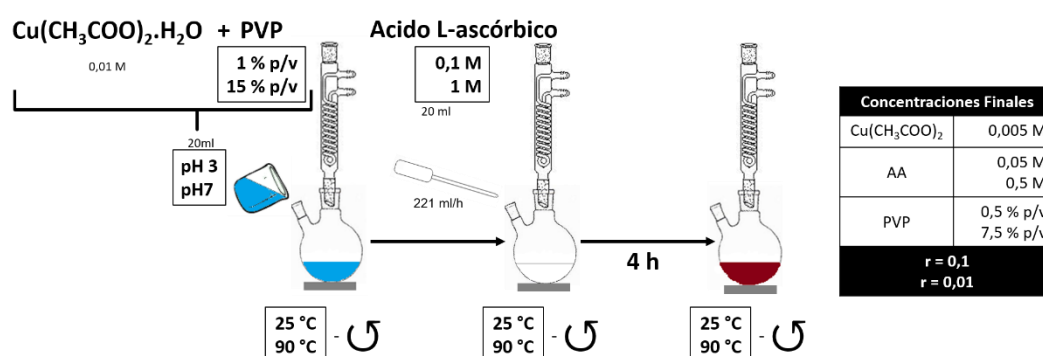
### 5.1.3. Ensayos del diseño experimental

En la Tabla 5.1 se muestran los diferentes ensayos planteados para llevar a cabo el diseño. A través del diseño factorial de nivel dos se asigna a cada variable un valor mínimo y máximo, además de un valor medio que permite obtener información sobre la reproducibilidad ya que las condiciones medias se repitieron cuatro veces (ensayos DEc2, 9, 11 y 12). El resto de los ensayos consisten en diferentes combinaciones de los valores máximos y mínimos de cada variable. Como respuestas a estudiar se seleccionaron la cantidad de precipitado, el diámetro hidrodinámico de las partículas y el SPR.

**Tabla 5.1. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (0,01 M). Ensayos del diseño experimental.**

Ensayo	r	[AA] (M)	T (°C)	pH	[PVP] (%p/v)	Precipitado (mg)	Tamaño (nm)	IPD	UV-vis (nm)	pH <sub>f</sub>
DE1	0,1	0,1	90	7	1	17,1	$409 \pm 17,2$	0,5	606	3,5
DEc2	0,02	0,55	58	5	8	12	$329,5 \pm 2,2$	0,3	592	2,1
DE3	0,01	1	90	7	15	11,2	$795,9 \pm 9,9$	0,4	589	2,6
DE4	0,01	1	25	7	1	12,8	$111,1 \pm 0,3$	0,3	581	2,3
DE5	0,01	1	25	3	15	-	$1380,0 \pm 110,3$	0,4	817	2,2
DE6	0,01	1	90	3	1	1,9	-	-	773	2,0
DE7	0,1	0,1	25	7	15	21,6	$123,3 \pm 2,0$	0,5	580	3,8
DE8	0,1	0,1	90	3	15	-	-	-	800	2,4
DEc9	0,02	0,55	58	5	8	7,6	$201,5 \pm 4,5$	0,3	583	2,2
DE10	0,1	0,1	25	3	1	-	-	-	812	2,1
DEc11	0,02	0,55	58	5	8	5,8	$131,1 \pm 1,3$	0,5	585	2,1
DEc12	0,02	0,55	58	5	8	9,5	$137,7 \pm 2,8$	0,3	579	2,1

Los ensayos se realizaron de manera aleatoria en el orden que figura en la Tabla 5.1 para proporcionar protección contra fuentes de variación desconocidas, no deseadas, que podrían sesgar los resultados [23]. Cada ensayo se realizó con la misma metodología (Figura 5.2). Por un lado se preparó 20 ml una solución de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,01 M y una de PVP según el ensayo a evaluar, y se llevó al pH predeterminado. Por otro lado se preparó 20 ml de una solución de AA. Primero se incorporó la solución de Cu/PVP a un balón previamente calentado a la temperatura de reacción y luego se agregó mediante bomba de jeringa la solución de AA (221 ml/h). La reacción se dejó a temperatura durante 4 h. En todos los casos se determinó el pH después de la reacción ( $\text{pH}_f$ ). Las suspensiones fueron centrifugadas a 12 mil rpm durante 10 min conservando por un lado el sobrenadante para determinar el SPR y el diámetro hidrodinámico y por el otro el precipitado para cuantificarlo.



**Figura 5.2. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Esquema de síntesis propuesto para el desarrollo de las experiencias del diseño experimental. En la tabla se indican las concentraciones finales de los reactivos.

#### 5.1.4. Resultados del diseño experimental

Una vez realizados los experimentos se completó la Tabla 5.1 con los valores correspondientes a cada respuesta. En algunos casos, no fue posible obtener datos numéricos de precipitado o tamaño de partículas. Por un lado, el precipitado no resultó una respuesta representativa debido a que hubo casos en los que el Cu se adhirió a la pared del balón y no fue posible determinar de manera exacta la cantidad (DEc2); y en otros no hubo reacción. Por lo tanto no se determinó ya que no correspondía a CuNp aglomeradas (DE5, DE8 y DE10). Respecto a la determinación de tamaño de partículas mediante DLS en algunos experimentos (DE6, DE8 y DE10) no se consideró debido a que

el resultado no cumplía con los criterios de calidad para la medida porque la muestra era muy polidispersa, presentaba agregados o sedimentos.

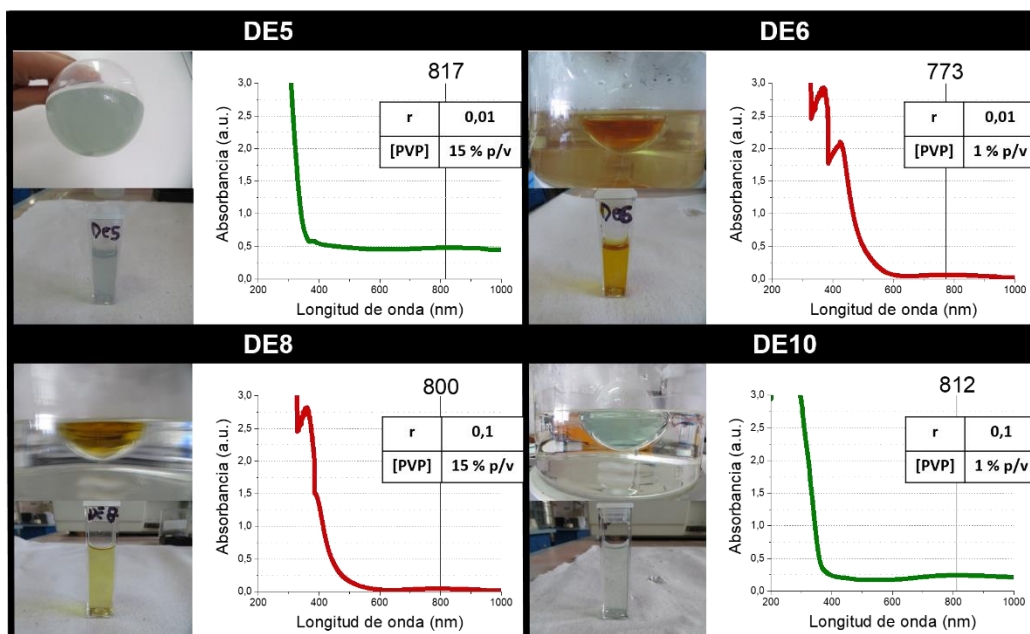
Las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5 muestran los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos. Se agruparon en función del pH = 3, 5 y 7 de las soluciones de Cu/PVP, respectivamente.

En primera instancia se puede deducir que el pH es la variable más influyente. Cabe señalar que a pesar de que se modificaron los pH de las soluciones Cu/PVP entre 3 y 7, los pH finales de las suspensiones ( $\text{pH}_f$ , Tabla 5.1) varían solo entre 2,01 – 3,84. Es decir que una vez producida la reacción, el  $\text{pH}_f$  desciende en todos los casos sin diferencias muy significativas.

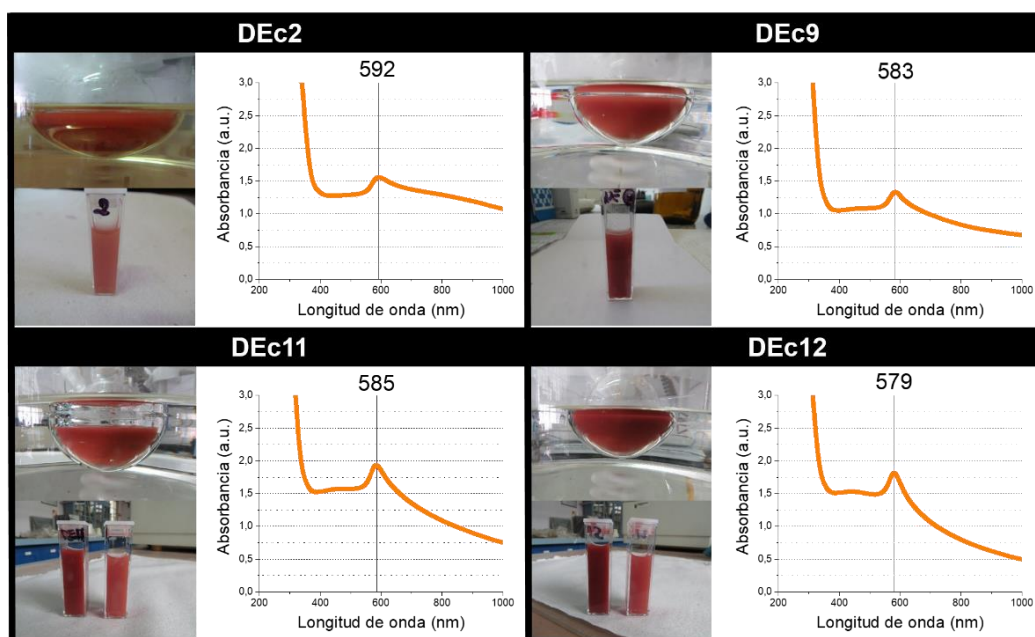
Cuando el pH de la solución Cu/PVP se llevó a pH=3 no se observaron evidencias de la presencia de CuNp. Los espectros no muestran el SPR característico de las CuNp (Figura 5.3) y se formaron agregados que precipitaron (Tabla 5.1). A 25°C (DE5 y DE10) la reacción de reducción no se produjo, lo cual se comprueba por la coloración azulada de las suspensiones y por la aparición de un máximo alrededor de 800 nm, correspondiente a la absorción de la sal precursora [24].

Por otro lado, a la temperatura de 90°C (DE6 y DE8) la suspensión se tornó naranja debido al ácido dehidroascórbico (ADHA), producto de la oxidación del AA. En el caso de la muestra DE6 se observan dos picos, uno alrededor de 370 nm y otro por encima de 400 nm. En cambio, en la muestra DE8, a 400 nm solo se observa un leve hombro.

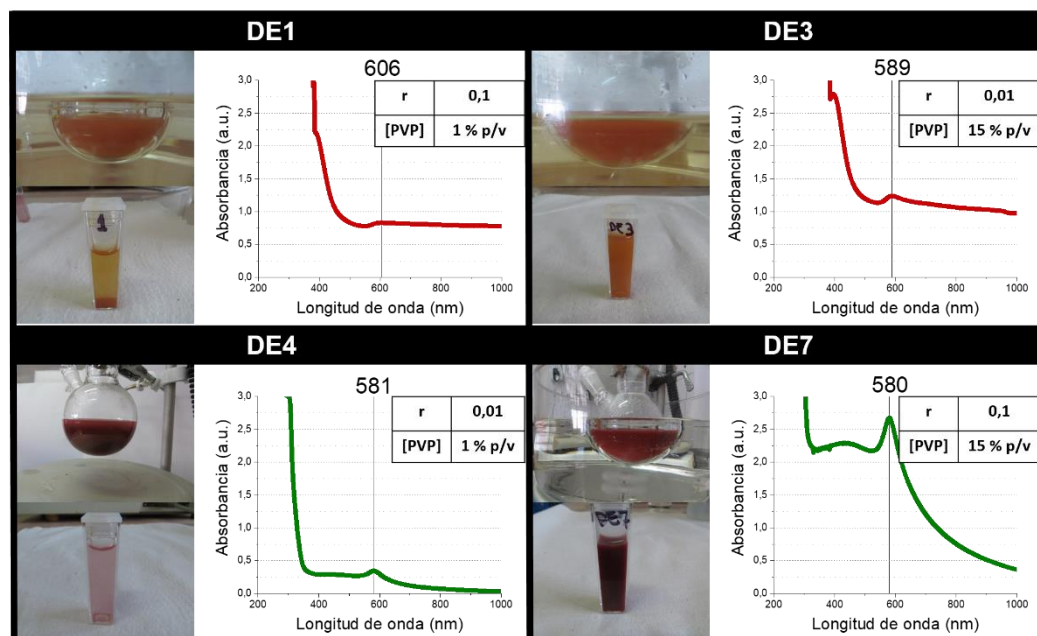
En ambos casos, la señal a 370 nm estaría vinculado a la absorbancia del producto de oxidación del AA (ADHA) [9, 10], debido a su inestabilidad frente al  $\text{O}_2$  y la temperatura [18, 19]. Mientras que a 400 nm estaría relacionado a la formación de  $\text{Cu}_2\text{O}$  [16, 17]. Esta diferencia podría deberse a la diferencia en la relación molar entre el Cu y el AA, la cual fue menor para la muestra DE6, indicando que una mayor [AA] favorecería la reducción del precursor metálico.



**Figura 5.3. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Tiempo de reacción: 4 h. Temperatura de reacción: 25°C (verde) y 90°C (rojo). Ensayos del diseño experimental correspondientes a la condición de pH = 3 de la solución Cu/PVP.**



**Figura 5.4. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .  $r = 0,02$ .  $[PVP] = 8\%$ . Tiempo de reacción: 4 h. Temperatura de reacción: 58°C. Ensayos del diseño experimental correspondientes a la condición de pH = 5 de la solución Cu/PVP.**



**Figura 5.5. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Tiempo de reacción: 4 h. Temperatura de reacción: 25°C (verde) y 90°C (rojo). Ensayos del diseño experimental correspondientes a la condición de pH = 7 de la solución Cu/PVP.**

Los ensayos por cuadruplicado de los valores centrales de las variables (Figura 5.4) evidenciaron el pico de SPR relacionado a la formación de CuNp. Las muestras DEc9, DEc11 y DEc12 resultaron reproducibles, excepto DEc2 que presentó un diámetro hidrodinámico de partículas mayor ( $329,5 \pm 2,2$ ), lo cual se corresponde con la SPR a mayor longitud de onda (592 nm) [8, 20, 21]. La diferencia podría deberse a que, durante la síntesis, se produjo la adherencia de cobre en las paredes del balón de vidrio. Los ensayos DEc9, 11 y 12 dieron lugar a la formación de CuNp a 58°C con color rojo vino, SPR cercanos a 580 nm y diámetros hidrodinámicos entre 130 y 200 nm (Figura 5.4 y Tabla 5.1).

En el caso de pH = 7, los espectros y los tamaños de partículas muestran la influencia tanto del pH de la solución Cu/PVP como de la temperatura (Figura 5.5 y Tabla 5.1). A diferencia de las muestras ajustadas a pH = 5, en todos los casos se evidenció la presencia del plasmón entre el rango 580 – 600 nm. Las reacciones llevadas a cabo a 25°C (DE4 y DE7) dieron lugar a la formación de una suspensión de CuNp de color rojo vino con una SPR alrededor de 580 nm con tamaños entre  $111 \pm 0,3$  y  $123,4 \pm 2,0$  nm. En cambio, a 90°C (DE1 y DE3) la suspensión obtenida presentó color naranja,

mostrando los picos de SPR a 606 y 583 nm vinculados a la presencia de partículas de mayor tamaño ( $409 \pm 17,2$  nm y  $795,9 \pm 9,9$  nm) [8, 20, 21]. Por último, a 25°C se observa un pico de absorbancia alrededor de 400 nm (DE7). Mientras que a 90°C se manifiesta un hombro acompañado de una absorbancia residual a mayores longitudes de onda ( $> 700$  nm). Como se mencionó anteriormente, señales alrededor de 400 nm indican la presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$  [16, 17] mientras que la absorbancia residual a mayores longitudes se relacionan con la oxidación superficial de las CuNp [22]. Es decir, en ambos casos se forman CuNp en presencia de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , pero a 90°C las CuNp se encuentran superficialmente oxidadas. Nuevamente, cuando la reacción se lleva a cabo a altas temperaturas y en presencia de aire, se favorecería la oxidación del AA [18, 19], disminuyendo su capacidad reductora.

A partir de este primer análisis de resultados se observa una clara influencia del pH de la solución de Cu/PVP y la temperatura en la calidad de las CuNp. Una de las ventajas de los diseños experimentales es el análisis estadístico de los resultados para determinar los factores más influyentes y las posibles interacciones entre las variables. De esta manera se prosiguió con la aplicación de diferentes herramientas estadísticas para el análisis de los resultados.

### 5.1.5. Análisis estadístico del diseño experimental

El análisis estadístico se realizó con herramientas de la versión libre de prueba del programa Design Expert. Para aplicar el método se descartó como respuesta la cantidad de precipitado ya que no resultó representativa para todos los casos, por lo que se trabajó con las respuestas tamaño de partícula y longitudes de onda en UV-vis.

A través de una cuadrícula de correlación en la intersección de dos variables se puede ver si existe una relación entre ellas y de qué tipo. La Tabla 5.2 muestra la correlación de las variables estudiadas asignando valores entre -1 y 1 según presenten relación negativa (azul) o positiva (rojo). Se observa que las [AA] y [PVP] mostraron una relación positiva con el tamaño de partículas, esto es, cuando la concentración aumentó el tamaño de partículas resultó mayor. En cambio el pH mostró una relación negativa tanto con el tamaño como con la posición del máximo de absorción en el espectro UV-vis, es decir que cuando la solución de Cu/PVP se llevó pH = 7 (valor máximo) ambas respuestas

presentaron valores mínimos. Por último se observa una relación positiva entre las respuestas de tamaño y UV-vis, esto significa que bajo la presencia de partículas grandes el máximo de absorción se desplazó a mayores longitudes de onda.

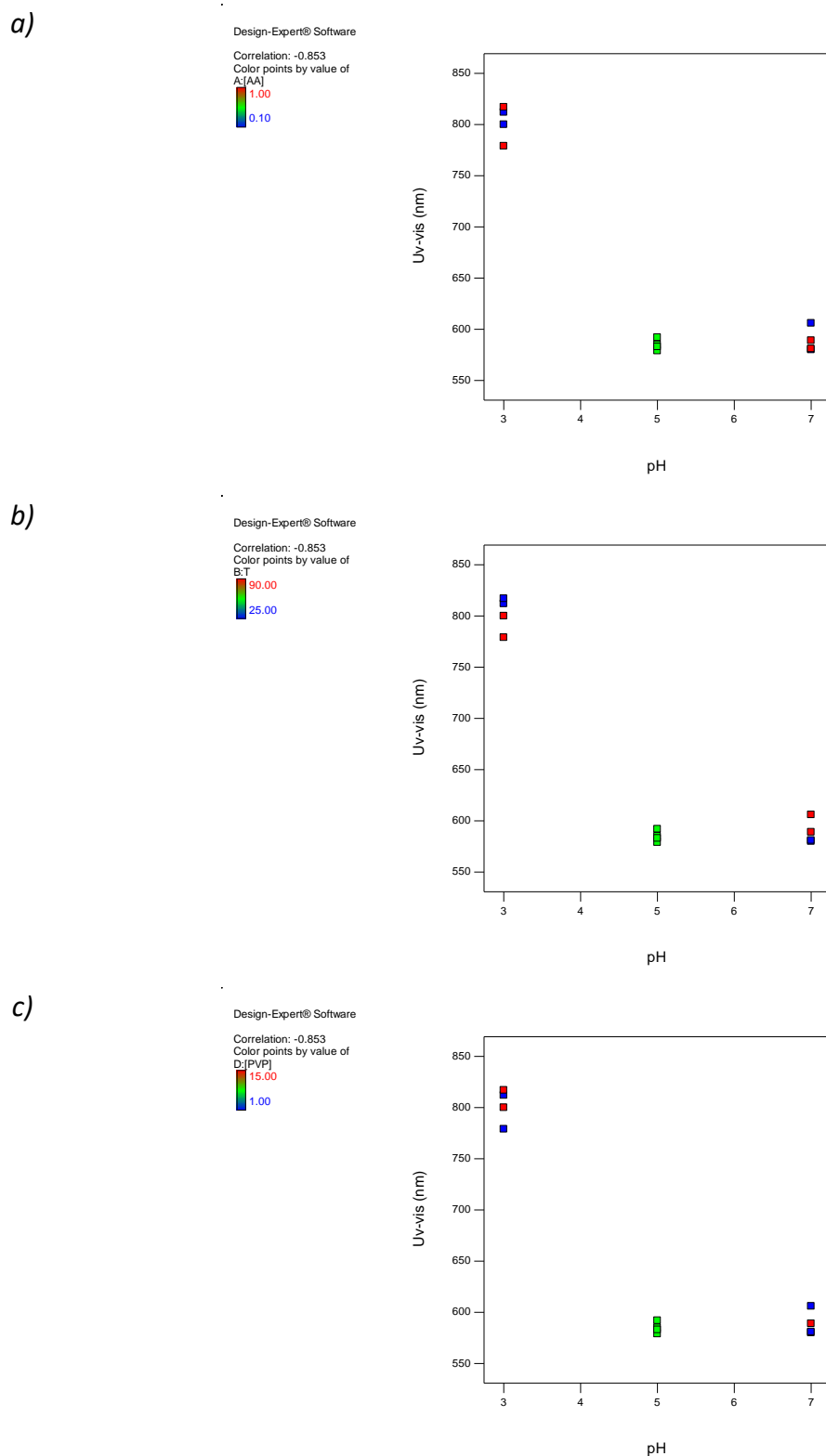
**Tabla 5.2. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Correlación entre las diferentes variables del diseño experimental.

	[AA]	T	pH	[PVP]	Tamaño	UV-vis
[AA]	1,00	0,00	0,00	0,00	0,51	-0,04
T	0,00	1,00	0,00	0,00	-0,003	-0,02
pH	0,00	0,00	1,00	0,00	-0,47	-0,85
[PVP]	0,00	0,00	0,00	1,00	0,52	0,01
Tamaño	0,51	-0,003	-0,47	0,52	1,00	0,88
UV-vis	-0,04	-0,02	-0,85	0,01	0,88	1,00

Las correlaciones presentan valores entre -1 (azul) y 1 (rojo), indicando relaciones negativas y positivas entre las variables.

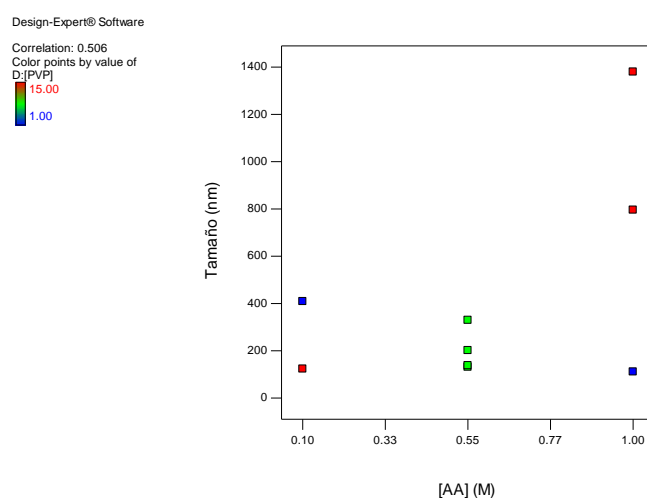
De todas las correlaciones, las que resultaron más fuertes fueron aquellas entre la absorción UV-vis – pH (-0,85) y absorción UV-vis – tamaño de partícula (0,88). Mientras que la correlación entre tamaño y [AA], [PVP] y pH fue más baja (0,51, 0,52 y -0,47, respectivamente). Esto mismo se evidencia a través de los gráficos de columna de la Figura 5.6. En éstos se relacionan el pH y las longitudes de onda de los espectros UV-vis bajo las diferentes condiciones máximas (rojo), medias (verde) y mínimas (azul) de [AA], temperatura y [PVP] (Figura 5.6-a, b y c, respectivamente). En los tres casos, independientemente de la [AA], la temperatura y la [PVP], se puede ver que cuando el pH de la solución Cu/PVP se ajustó en 3 se obtuvieron valores máximos de longitud de onda, mientras que con pH 5 y 7 los valores se encontraron alrededor de 580 nm. Es decir que las modificaciones de [AA], temperatura y [PVP] no generaron una influencia significativa sobre la posición del pico de SPR en el espectro UV-vis.



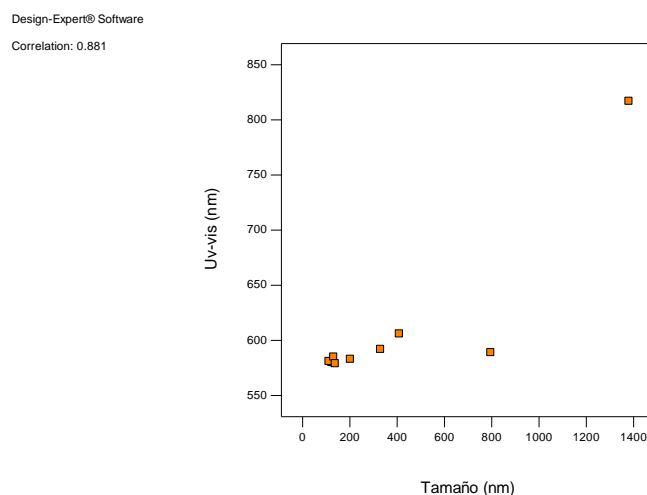


**Figura 5.6. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Gráficos de columna que relacionan la variable pH con la respuesta UV-vis bajo las diferentes condiciones: máximas (rojo), medias (verde) y mínimas (azul) de a) [AA], b) temperatura y c) [PVP].

La Figura 5.7 muestra el gráfico de columnas que relaciona el tamaño de partículas con la [AA] bajo las distintas [PVP]. Nuevamente, se distingue que la correlación no mostró una relación importante, al igual que con el pH (no se muestra el gráfico de columna). Y la Figura 5.8 muestra la relación entre el tamaño y la posición del máximo de absorbancia en el espectro UV-vis. Exceptuando la muestra de partículas de aproximadamente 800 nm (DE3), las partículas de menor tamaño arrojaron un espectro con longitudes de ondas más bajas, mientras que las partículas más grandes presentaron absorbancias en longitudes de onda mayores.



**Figura 5.7. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Gráficos de columna que relaciona la variable [AA] con la respuesta tamaño de partículas bajo las diferentes condiciones: máximas (rojo), medias (verde) y mínimas (azul) de [PVP].



**Figura 5.8. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Gráficos de columna que relaciona las respuestas UV-vis con tamaño de partículas.

El análisis se continuó con la respuesta de los espectros UV-vis, ya que la falta de datos en la respuesta de tamaño de partículas no permitió un buen análisis estadístico.

A partir de herramientas estadísticas se puede desarrollar un modelo que relacione los factores e interacciones de factores más importantes con la respuesta [2]. La ecuación de este modelo se puede utilizar para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada variable y es útil para identificar el impacto relativo de las variables comparando los coeficientes de cada una. De esta manera, a partir de las correlaciones observadas se puede establecer la siguiente ecuación para la respuesta UV-vis:

$$\text{UV-vis} = 658,6 - 106,5 * \text{pH} + 10,5 * [\text{AA}] [\text{PVP}] \quad \text{Ec. 03}$$

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) del modelo se determinó un p-valor = 0,0026 ( $p < 0,05$ ), por lo que se considera estadísticamente significativo [2].

Una vez verificada la validez del modelo a través del análisis de los residuos [2], se puede evaluar la influencia de los factores significativos y las interacciones. El modelo plantea que los factores influyentes son el pH y la interacción entre la [AA] y la de [PVP]. Cabe destacar que la temperatura no se encuentra incluida en la ecuación del modelo ya que a través de los análisis no se consideró un factor influyente (Tabla 5.2).

La Figura 5.9 muestra el modelo gráfico de la interacción entre la [AA] y [PVP] para la respuesta UV-vis. De acuerdo a la gráfica, el pico de absorbancia se obtiene a menor longitud de onda cuando la [AA] es 0,1 M y la [PVP] 15% p/v; y cuando la concentración de [AA] es 1 M y la de [PVP] 1% p/v. Sin embargo, debido a la desviación estándar no hay diferencia significativa entre estos puntos. Es decir que si se realiza una síntesis de CuNp a 57,5°C y pH 5 (Figura 5.9-a), independientemente de la combinación de [AA] y [PVP] que se emplee, el máximo de absorbancia estará entre 600 y 700 nm, aproximadamente. En cambio, si la síntesis se realiza a pH 3 (Figura 5.9-b), si bien se mantiene la relación inversa entre la [AA] y [PVP] sin diferencias significativas, el rango de longitudes de onda asciende entre 700 y 800, aproximadamente. Pero si el pH es 7 (Figura 5.9-c) el rango de longitudes de onda de la máxima absorción de las CuNp desciende a 500 y 600 nm.

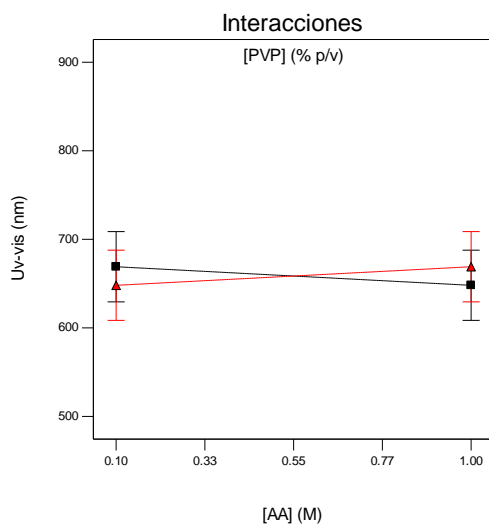
a)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)

X1 = A: [AA]  
X2 = D: [PVP]

Actual Factors  
B: T = 57.50  
C: pH = 5.00

■ D- 1.00  
▲ D+ 15.00



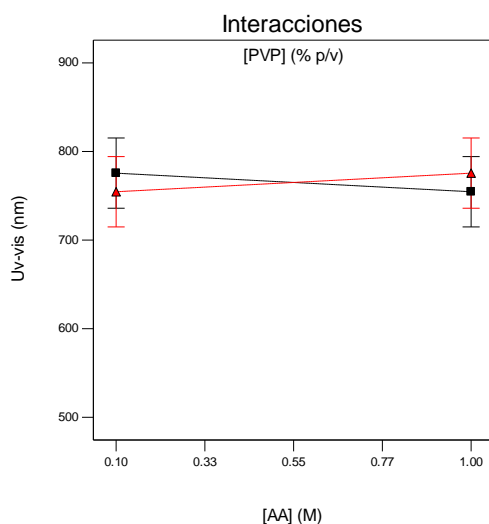
b)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)

X1 = A: [AA]  
X2 = D: [PVP]

Actual Factors  
B: T = 57.50  
C: pH = 3.00

■ D- 1.00  
▲ D+ 15.00



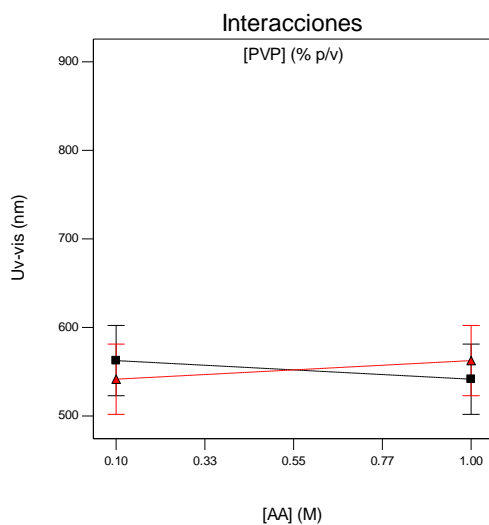
c)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)

X1 = A: [AA]  
X2 = D: [PVP]

Actual Factors  
B: T = 57.50  
C: pH = 7.00

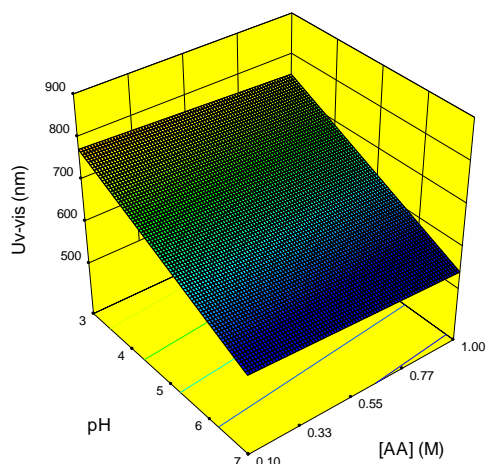
■ D- 1.00  
▲ D+ 15.00



**Figura 5.9. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Gráfico de interacción entre la [AA] y [PVP] para la respuesta UV-vis, bajo las distintas condiciones de pH de la solución Cu/PVP: a) pH 5, b) pH 3 y c) pH 7.**

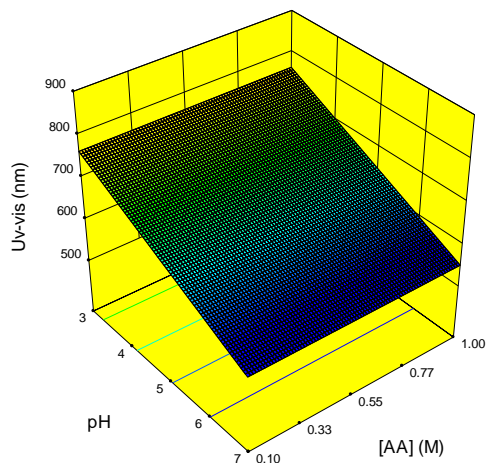
a)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)  
817  
579  
X1 = C: pH  
X2 = A: [AA]  
Actual Factors  
B: T = 57.50  
D: [PVP] = 1.00



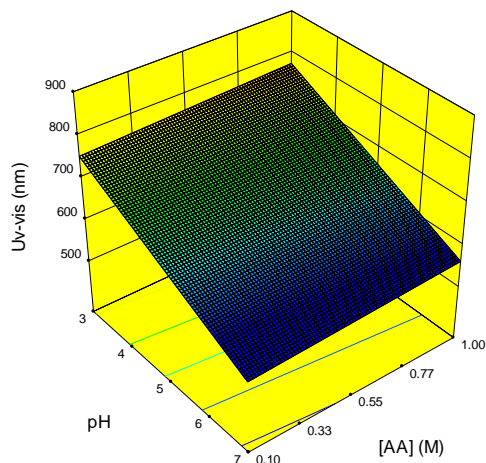
b)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)  
817  
579  
X1 = C: pH  
X2 = A: [AA]  
Actual Factors  
B: T = 57.50  
D: [PVP] = 8.00



c)

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Uv-vis (nm)  
817  
579  
X1 = C: pH  
X2 = A: [AA]  
Actual Factors  
B: T = 57.50  
D: [PVP] = 15.00

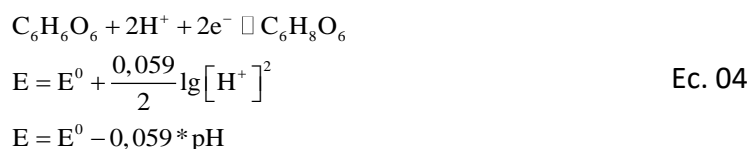


**Figura 5.10. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Reductor: AA. Gráficos predictivos de la relación entre el pH, la [AA] y la respuesta UV-vis, cuando la [PVP] es 1%, 8% y 15% p/v (a, b y c, respectivamente). La transición de color del azul al rojo indica la variación de absorbancias máximas de 580 a 800 nm.**

Esto mismo se puede representar a través de modelos gráficos predictivos. En la Figura 5.10 se muestra la relación entre el pH, la [AA] y la respuesta UV-vis, cuando la [PVP] es 1%, 8% y 15% p/v (Figura 5.10-a, b y c, respectivamente). El color azul indica longitudes de onda alrededor de 580 nm, a medida que la longitud aumenta el color cambia a celeste, verde hasta llegar al rojo que corresponde a longitudes de 800 nm, aproximadamente. Se observa que para obtener CuNp que presenten absorbancias en longitudes de onda de alrededor de 580 nm se debe trabajar con una solución de Cu/PVP a pH = 7. Si la [PVP] es de 8% p/v (Figura 5.10-b), la [AA] no tiene influencia sobre la absorbancia. Si [PVP] es de 1% p/v (Figura 5.10-a), conviene utilizar una [AA] de 1 M; y si la [PVP] es de 15% p/v (Figura 5.10-c) una [AA] de 0,1 M. Sin embargo, no se ve una diferencia significativa sobre la longitud de onda al variar las concentraciones.

Por consiguiente, a través del diseño experimental se logró evidenciar que, para el protocolo de síntesis de CuNp planteado con AA como agente reductor y Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> como precursor metálico:

- El factor más influyente sobre la respuesta UV-vis resultó ser el pH. Tanto el análisis de los espectros (Figuras 5.3, 5.4 y 4.5) como del modelo planteado reflejan que un aumento del pH de la solución Cu/PVP favorece a la obtención de CuNp. De hecho, se encuentra reportado que para la reacción de reducción del Cu empleando AA existe un pH óptimo. Por un lado, hay una fuerte relación entre el pH y el poder reductor del AA, expresada a través de la ecuación de reducción (Ecuación 04), donde observa que el potencial disminuye con el aumento de pH [3]. Y por otro lado, a pH muy alcalinos el AA resulta inestable de manera que la reacción de reducción no se produce [7].



- La [AA], la [PVP] y el pH mostraron una leve influencia sobre el tamaño de partículas. La [AA] y la [PVP] mostraron una relación positiva, es decir que el aumento de la concentración produce un aumento del tamaño hidrodinámico.

Mientras que un aumento de pH conduce a una disminución del tamaño de partículas [7].

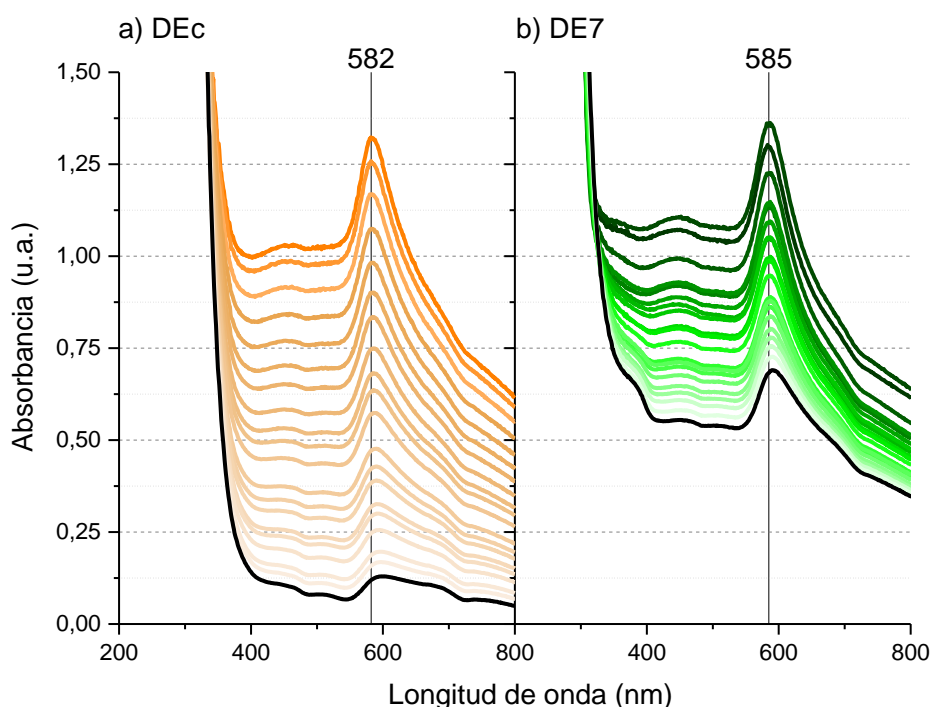
- La [AA] y la [PVP] no resultaron ser factores influyentes sobre la respuesta UV-vis, pero si su interacción. Es decir, que para obtener menores longitudes de onda se debería emplear una mínima [AA] y una máxima de [PVP], o a la inversa. Sin embargo, en el caso de seleccionar la mínima concentración para ambos reactivos no se observa una diferencia significativa sobre la longitud de onda del máximo de absorbancia.
- A través del análisis estadístico, la temperatura no mostró una fuerte influencia sobre las respuestas analizadas. Sin embargo, tras analizar las características de las reacciones y de los espectros UV-vis se observó un claro efecto sobre la calidad de las CuNp. Esto podría deberse a que un aumento de la temperatura favorecería la oxidación del AA en presencia de O<sub>2</sub>, disminuyendo su capacidad de reducir el precursor metálico [18, 19]. De esta manera se produciría la formación de Cu<sub>2</sub>O y/o la oxidación superficial de las CuNp. Lo cual no implica una modificación significativa de la posición del máximo de absorción UV-vis relacionado a las CuNp, sino que se producen absorbancias a otras longitudes de onda.
- Existe una relación positiva entre el tamaño de partículas y la posición del máximo de absorbancia en el espectro UV-vis, es decir que al aumentar el tamaño aumenta la longitud de onda del máximo de absorbancia. Esto coincide con observaciones realizadas anteriormente y con lo reportado en bibliografía [8, 20, 21].

Por lo tanto, si nuestro objetivo es obtener CuNp con diámetros hidrodinámicos alrededor de 100 nm debemos lograr suspensiones de partículas con un SPR alrededor de 580 nm. Esto se puede lograr llevando a pH 7 la solución de Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> y PVP, utilizando concentraciones de 0,1 M de AA y 1% p/v de PVP a 25°C.

#### 5.1.6. Estabilidad en solución de las CuNp en función del tamaño de partículas

Se seleccionaron las muestras DEc y DE7 para evaluar la estabilidad de las suspensiones de CuNp en función del tamaño de partículas. Para ello se determinaron espectros UV-

vis cada una hora durante un periodo de 20 hs (la curva negra corresponde al último espectro a las 20 h,  $t_{20}$ , Figura 5.11). La muestra DEc (Figura 5.11-a) exhibió una señal de SPR estrecha a 582 nm que se fue ensanchando y desplazando hacia mayores longitudes de onda a lo largo del tiempo. En cambio, la muestra DE7 presentó un pico de SPR a 585 nm que se mantuvo prácticamente invariable durante el tiempo de evaluación, disminuyendo solamente el máximo de intensidad.



**Figura 5.11. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Tiempo de reacción: 4 h. Estabilidad de suspensiones de CuNp durante 20 hs (Curva negra corresponde al último espectro a las 20h,  $t_{20}$  h). a) DEc:  $r$ : 0,02, [PVP]: 8 % p/v, pH = 5, temperatura de reacción: 58°C. b) y DE7:  $r$ : 0,1, [PVP]: 15 % p/v, pH = 7, temperatura de reacción: 25°C.**

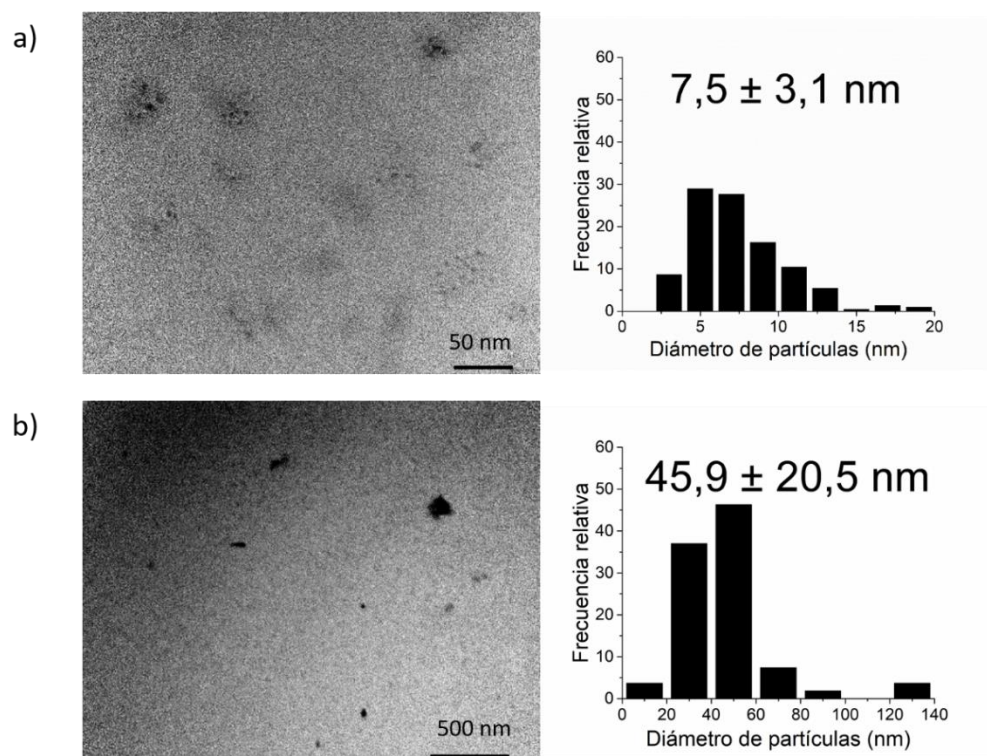
Estos resultados se corresponden con los obtenidos con de DLS (Tabla 5.3). A  $t_0$  las partículas DEc presentaron un diámetro hidrodinámico menor ( $166,0 \pm 0,8$  nm) que las DE7 ( $204,0 \pm 4,7$  nm). Lo que coincide con las posiciones de las señales de SPR, menor tamaño de partículas menor longitud de onda de la posición del plasmón. Sin embargo, luego de  $t_{20}$  el diámetro aumentó a  $190,8 \pm 2,2$  nm, mientras que las DE7 se mantuvieron con un diámetro de  $200,1 \pm 5,1$  nm. Nuevamente, esto se refleja en los espectros UV-vis donde la DEc muestra un corrimiento y ensanchamiento de la señal hacia mayores longitudes y la DE7 se mantiene estable [8, 20, 21].



**Tabla 5.3. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Tiempo de reacción: 4 h. Tamaño hidrodinámico de suspensiones de CuNp a  $t_0$  y luego de 20 h ( $t_{20\text{ h}}$ ). DEc: r: 0,02, [PVP]: 8 % p/v, pH = 5, temperatura de reacción: 58°C. DE7: r: 0,1, [PVP]: 15 % p/v, pH = 7, temperatura de reacción: 25°C.**

Muestra	$t_0$ C		$t_{20\text{ h}}$	
	Tamaño (nm)	IPD	Tamaño (nm)	IPD
DEc	$166,0 \pm 0,8$	0,2	$190,8 \pm 2,2$	0,3
DE7	$204,0 \pm 4,7$	0,3	$200,1 \pm 5,1$	0,3

Por último, en la figura 5.12 se muestran micrografías de TEM de ambas muestras junto a los histogramas de distribución de tamaños tomadas a  $t_0$ . Los diámetros de las suspensiones DEc y DE7 fueron  $7,5 \pm 3,1$  nm (Figura 5.12-a) y  $49,9 \pm 20,5$  nm (Figura 5.12-b), respectivamente.



**Figura 5.12. Síntesis de CuNp en sistema discontinuo. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Tiempo de reacción: 4 h. Comparación de tamaños de suspensiones de CuNp a  $t_0$ . Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de partículas. a) DEc: r: 0,02, [PVP]: 8 % p/v, pH = 5, temperatura de reacción: 58°C. b) DE7: r: 0,1, [PVP]: 15 % p/v, pH = 7, temperatura de reacción: 25°C.**

En ambos casos los diámetros son mayores que los determinados mediante DLS, pero se mantiene el hecho de que las partículas de la muestra DEc fueron menores a las de DE7. Esta diferencia se debe a que distintos métodos de análisis de tamaños pueden dar resultados diferentes de una misma muestra debido a que se basan en principios físicos diferentes. En este caso, con DLS se analizan partículas en suspensión y se determina el diámetro hidrodinámico, mientras que con TEM se analizan partículas secas [25].

Estos resultados indican que un tamaño promedio mayor de partículas favorece a la estabilidad en solución de las CuNp. Lo cual es importante para el objetivo de lograr una actividad bactericida sostenida en el tiempo.

A partir de las conclusiones abordadas mediante el DE se establecen las condiciones de síntesis planteadas para DE7 para estudiar la síntesis en sistema continuo.

## 5.2. Síntesis en sistema continuo

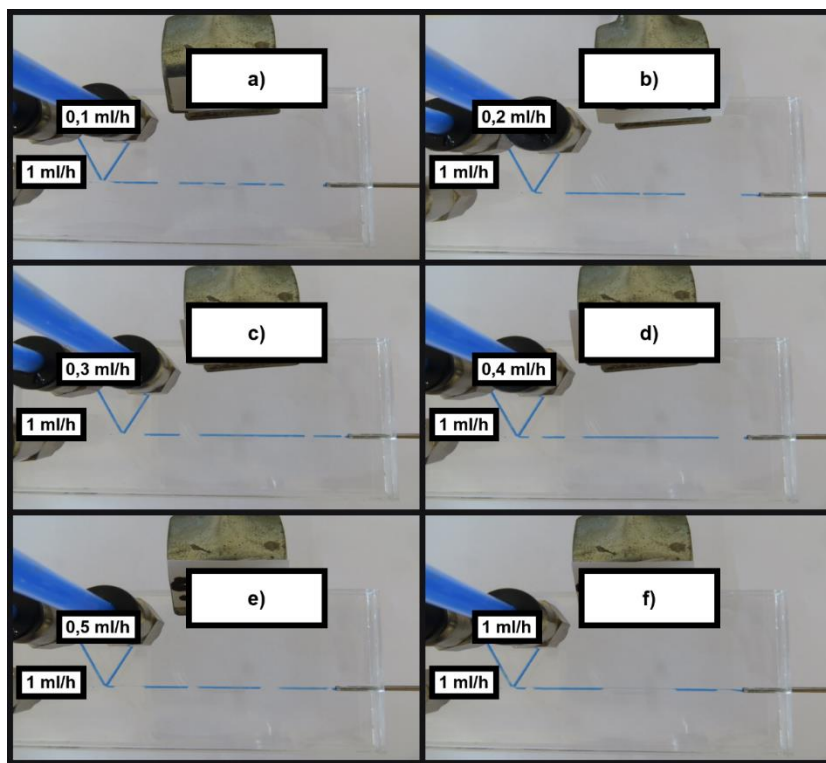
Finalmente se lograron las características buscadas de CuNp mediante un protocolo en sistema discontinuo compatible con el medio ambiente utilizando AA como agente reductor y PVP como estabilizante. Por lo que se decidió evaluar en sistema continuo las condiciones seleccionadas mediante el diseño experimental.

### 5.2.1. Optimización del flujo segmentado en micromezclador de salida lateral

El estudio de la reducción de Cu con  $N_2H_4$  (Capítulo 4.3) permitió observar que en el sistema continuo segmentado el cambio de diámetro interno entre el canal del micromezclador y la tubería de salida (2 mm) perjudica el régimen homogéneo de las microgotas. Por lo tanto se propuso un nuevo diseño de micromezclador manteniendo el canal en forma recta pero con salida lateral conectado con una tubería de salida de menor diámetro interno (1 mm).

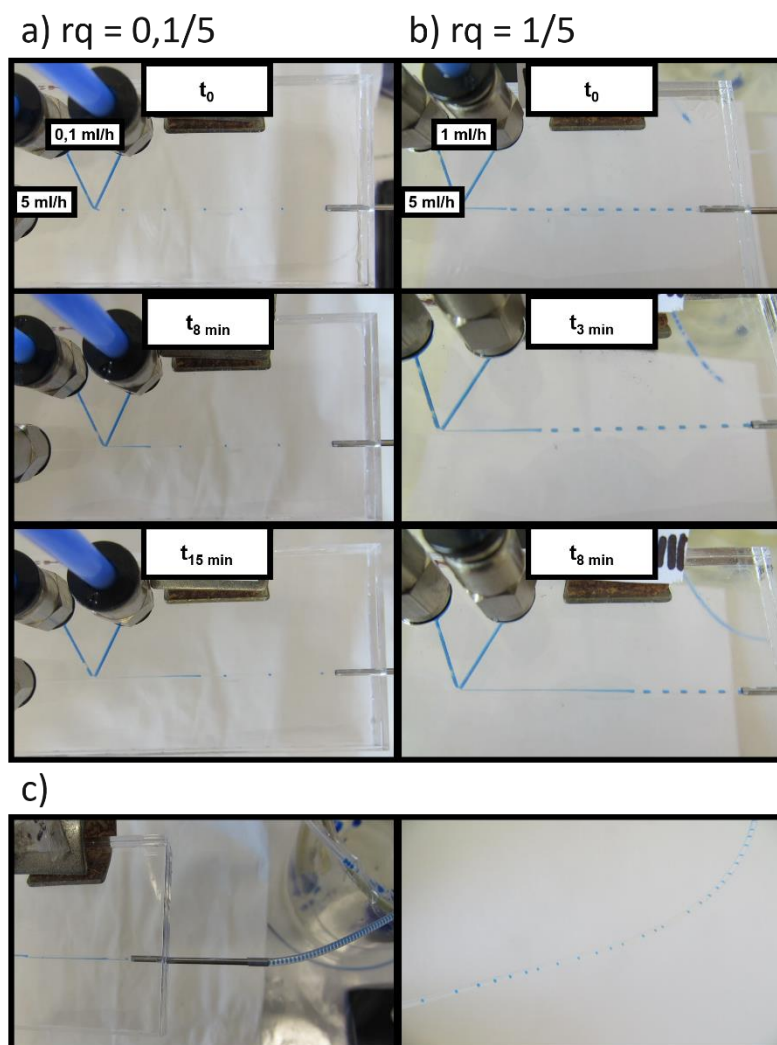
Se evaluaron diferentes relaciones de caudales de las fases acuosas respecto de la fase oleosa ( $r_q$  = caudal de las fases acuosas/caudal de la fase oleosa en ml/h;  $r_q$  = 0,1/1, 0,2/1, 0,3/1, 0,4/1, 0,5/1 y 1/1) empleando agua coloreada para optimizar la formación de las microgotas (Figura 5.13). En ninguno de los casos se logró obtener un régimen de

microgotas homogéneo y se produjo adherencia de la fase acuosa sobre la pared impidiendo la formación de gotas.



**Figura 5.13. Optimización del flujo segmentado micromezclador de canal recto con salida lateral.** Fotografías digitales de la optimización de regímenes de microgotas empleando aceite mineral (Sigma-Aldrich), a)  $rq = 0,1/1$ , b)  $rq = 0,2/1$ , c)  $rq = 0,3/1$ , d)  $rq = 0,4/1$ , e)  $r = 0,5/1$  y f)  $rq = 1/1$ . La fase coloreada es acuosa.

Como alternativa, se propuso modificar la fase oleosa y su caudal. En lugar de aceite mineral (Sigma-Aldrich) se utilizó aceite puro de girasol (Natura) y el caudal se aumentó a 5ml/h, manteniendo las fases acuosas a 0,1 y 1 ml/h (Figura 5.14-a y b, respectivamente). En este caso se logró la formación de microgotas con ambas relaciones. Sin embargo, al cabo de unos minutos se produjo la adherencia de la fase acuosa en la zona de unión. De todas formas el régimen de gotas se mantuvo a lo largo de la tubería de salida (Figura 5.14-c).

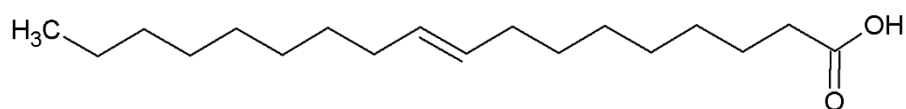


**Figura 5.14. Optimización del flujo segmentado micromezclador de canal recto con salida lateral.** Fotografías digitales de la optimización de regímenes de microgotas empleando aceite puro de girasol (Natura), a)  $rq = 0,1/5$  y b)  $rq = 01/5$ , c) a distintos tiempos. c) Régimen de gotas a la salida del micromezclador. La fase coloreada es acuosa.

La composición del aceite de girasol contiene ácidos grasos insaturados, los cuales presentan propiedades de surfactantes [26]. Los surfactantes son moléculas anfifílicas, que poseen grupos con afinidades diferentes hacia dos fases inmiscibles. Esto hace que disminuya la tensión superficial entre las fases, promoviendo la formación de las gotas y evitando su coalescencia [27]. Por lo tanto, la presencia de ácidos grasos en el aceite de girasol disminuyen la tensión superficial del sistema, mejorando las propiedades de mojado de las paredes del canal por parte de la fase continua y favoreciendo la formación de las microgotas. A su vez, un régimen de gotas aisladas se ve favorecido por elevados caudales de la fase continua y bajos caudales de la fase dispersa [28-31], es

decir que el aumento del caudal de aceite también favoreció a la obtención de un régimen más homogéneo de gotas.

Con el objetivo de impedir por completo la adherencia de la fase acuosa sobre la pared del canal se propuso incorporar ácido oleico a la fase oleosa para aumentar la concentración de surfactante. El ácido oleico (Figura 5.15) es un ácido graso monoinsaturado característico de los aceites vegetales y se clasifica como surfactante no iónico y lipofílico, por lo tanto es soluble en la fase oleosa [32].



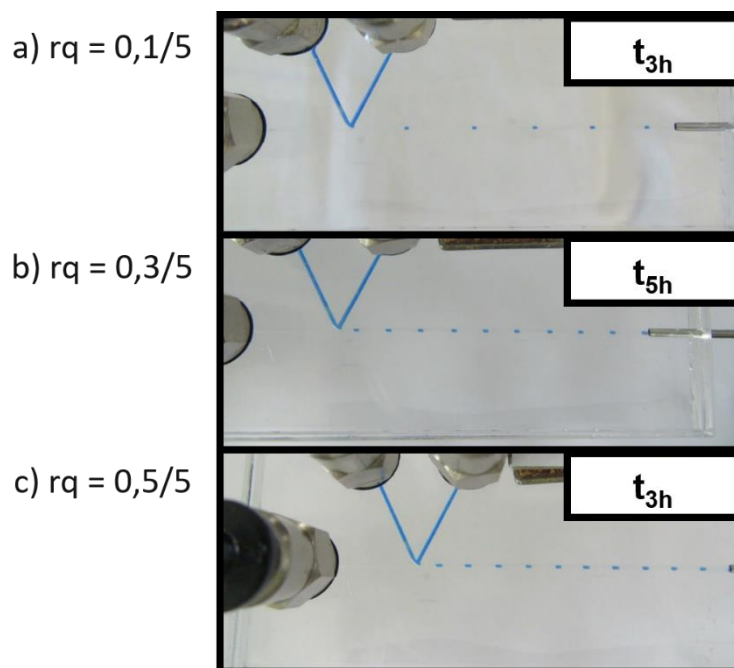
*Ácido oleico*

**Figura 5.15. Ácido oleico.** Estructura del ácido oleico propuesto como surfactante no iónico y lipofílico.

Se preparó una solución de ácido oleico en aceite de girasol con una dilución 1/500 y se evaluaron  $rq = 0,1/5$ ,  $0,3/5$  y  $0,5/5$  (Figura 5.16-a, b y c, respectivamente). Bajo estas condiciones se logró un muy buen régimen de gotas que se mantuvo sin adherencias sobre las paredes hasta 5 horas (Figura 5.16-b). A fines prácticos la  $rq = 0,1/5$  generó un flujo muy lento y con  $rq = 0,5/5$  se produjo la coalescencia de las gotas a lo largo de la tubería de salida.

Con estos resultados se comprueba que propiedades de humectación de las paredes del canal y las velocidades de las fases influyen sobre la distribución de las fases en el flujo. Para obtener regímenes de flujo regulares, la fase continua debe humedecer las paredes del microcanal preferentemente sobre la fase dispersa. Y para lograr gotas aisladas de tamaño regular se requieren, en general, velocidades relativamente altas de la fase continua (oleosa), y velocidades bajas de la fase dispersa (acuosa) [33].

Para evaluar la reacción de reducción de cobre con AA se seleccionó  $rq = 0,3/5$  con las condiciones elegidas en el sistema discontinuo a través del diseño experimental (DE7).



**Figura 5.16. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto.** Fotografías digitales de la optimización de regímenes de microgotas empleando aceite de girasol con ácido oleico ( $d = 1/500$ ) como surfactante, a)  $rq = 0,1/5$ , b)  $rq = 0,3/5$ , c)  $rq = 0,5/r$ . La fase coloreada corresponde a la acuosa.

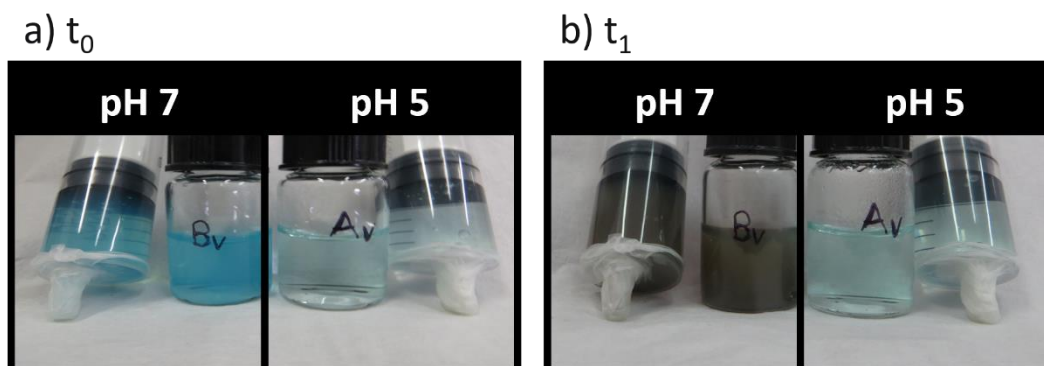
### 5.2.2. Síntesis de CuNp en sistema continuo de fase segmentada

Con los resultados obtenidos aplicando el DE propuesto se establecieron las condiciones de síntesis de CuNp DE7 (Tabla 5.1) para la reproducción en el sistema continuo de fase segmentada empleando chip de microfluídica con una  $rq = 0,3/5$ .

Sin embargo, surgió el inconveniente de que la solución Cu/PVP a  $pH = 7$  resultó inestable en la jeringa ya que se observaba una modificación de color de azul a marrón. Para evaluar las causas de este efecto, es decir el  $pH$  o la interacción con el material de la jeringa, se prepararon soluciones de Cu/PVP a  $pH = 7$  y  $5$ , colocando una parte en recipiente de vidrio y otra en una jeringa plástica (Figura 5.17). Como resultado se observó que la suspensión no resultó estable en el tiempo a  $pH = 7$ , independientemente del material del recipiente. Shahmiri y col. [34] estudiaron la influencia del  $pH$  en la síntesis de nanoláminas de CuO en presencia de PVP. Efectivamente, a  $pH$  menores que  $pH = 5,2$  la solución mantuvo su color azul; mientras que a  $pH$  mayores que  $pH = 9,7$  se generó un precipitado color negro, indicando la

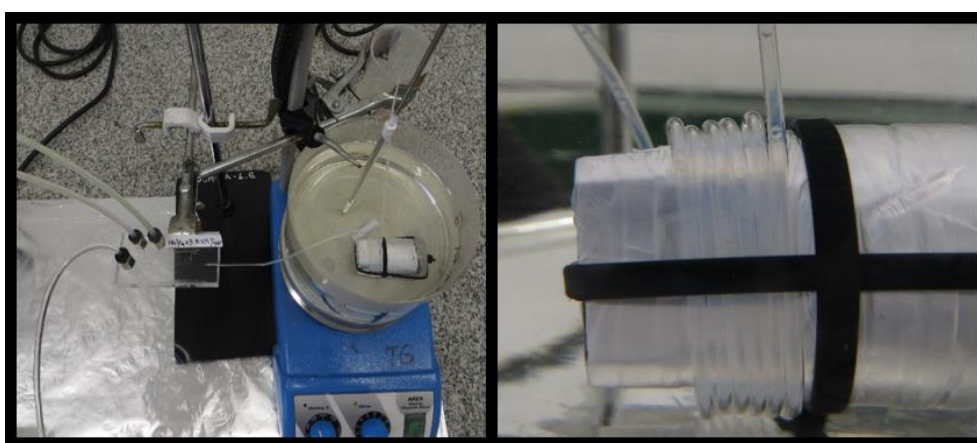


formación de CuO [12, 35]. Por lo tanto, mientras el sistema está en funcionamiento en la solución de Cu/PVP a pH = 7 contenida en la jeringa se genera de CuO.



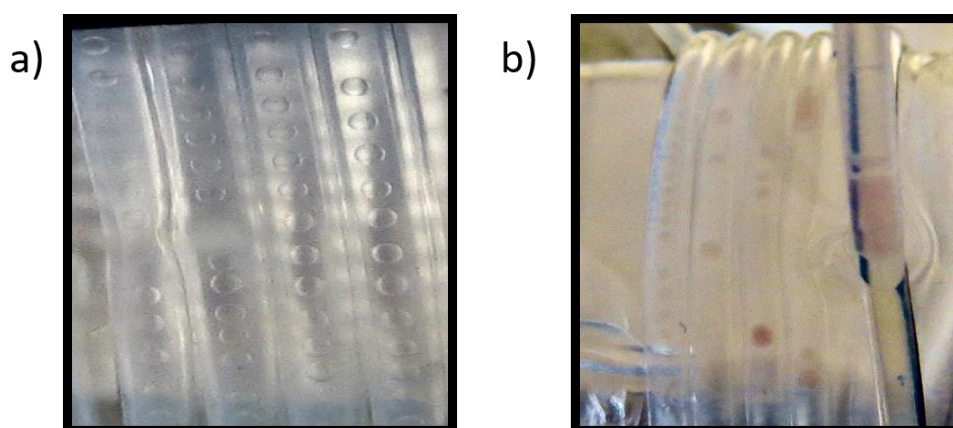
**Figura 5.17. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Estabilidad de la solución Cu/PVP. Fotografías digitales suspensiones de Cu/PVP a pH = 7 y 5 almacenadas en jeringa plástica y frasco de vidrio, a) recién preparadas ( $t_0$ ) y b) luego de un día de almacenamiento ( $t_1$ ).**

Por este motivo se resolvió continuar trabajando con las condiciones medias del DE (DEc) ya que a pH = 5 la solución si resultó estable en el tiempo. De esta manera, se evaluó la síntesis con una [PVP] de 8% p/v, [AA] 0,55 M, manteniendo el pH de la solución Cu/PVP en pH = 5 y la temperatura de reacción en 58°C. El sistema se llevó a temperatura sumergiendo la tubería de salida en baño termostático de glicerina (Figura 5.18).



**Figura 5.18. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Fotografías digitales del sistema utilizado para la síntesis a 58°C.**

Tal como se observa en la Figura 5.19-a, no se produjo ningún cambio de color que indique algún tipo de reacción en la tubería. Esto se resolvió triplicando las concentraciones de todos los reactivos pero manteniendo la relación molar Cu/AA en  $r = 0,02$  (DEc x3). Así, al aumentar la concentración de ambos reactivos, el cambio de color se observó a simple vista poniendo de manifiesto la formación de CuNp (Figura 5.19-b).



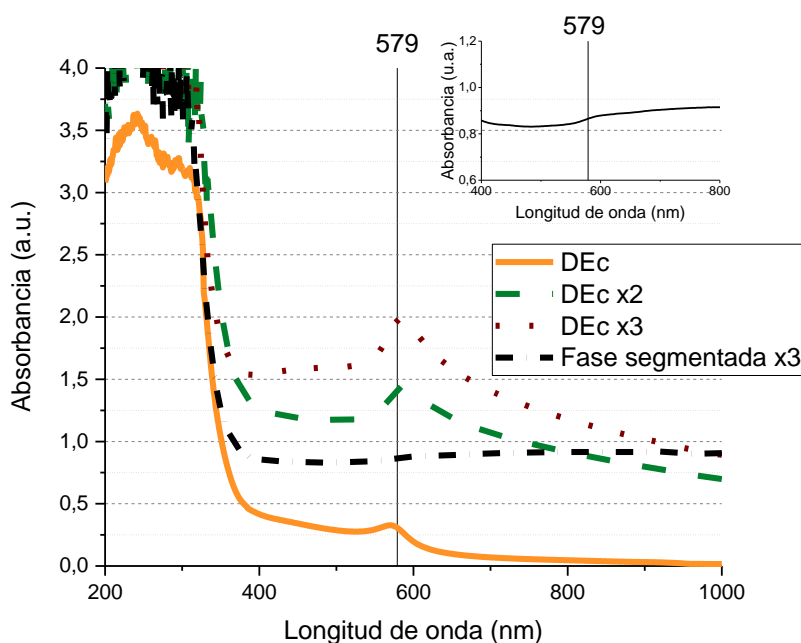
**Figura 5.19. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Temperatura:  $58^\circ\text{C}$ . Fotografías digitales de las microgotas en el interior de la tubería de salida empleando  $r_q = 0,3/5$ . a) Síntesis empleando las concentraciones de las condiciones DEc, b) Síntesis triplicando las concentraciones de las condiciones DEc (DEc x3).**

De acuerdo al modelo de LaMer [36] se deben tener en cuenta los siguientes factores: (i) la formación de átomos de  $\text{Cu}^0$  a partir de la reacción entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y el AA, (ii) la formación de núcleos una vez alcanzada una concentración determinada de  $\text{Cu}^0$  y (iii) el crecimiento de los núcleos una vez que alcanzan cierto tamaño. Esto significaría que la reacción de reducción en la Figura 5.19-a se produjo, pero debido al confinamiento de las gotas la nucleación habría resultado más lenta sin llegar a formarse núcleos con el tamaño necesario para que continúen el proceso de crecimiento. Por eso macroscópicamente el cambio de color no se hizo evidente ya que las partículas resultaron extremadamente pequeñas. En cambio, en el sistema discontinuo el cambio de color se observa a simple vista ya que los núcleos formados continúan creciendo sin ninguna limitación (Figura 5.4). Por otro lado, al triplicar las concentraciones (Figura 5.19-b), se genera una mayor concentración de átomos de  $\text{Cu}^0$ , lo cual provocaría un aumento de la velocidad de nucleación, favoreciendo la formación de núcleos que



logran crecer hasta formar CuNp, evidenciándose por el cambio de color en el interior de las gotas (Figura 5.17-b).

En la Figura 5.20 se muestra el espectro UV-vis de muestras sintetizadas en sistema discontinuo en las condiciones DEc, modificando la dilución: duplicando y triplicando la concentración (DEc x2 y DEc x3) y de la muestra sintetizada en sistema continuo de fase segmentada al triplicar las concentraciones (Fase segmentada x3). Como es de esperar, para el caso de las muestras obtenidas mediante sistema discontinuo se observa la presencia del SPR alrededor de 579 nm con un aumento de intensidad a medida que se aumenta la concentración de reactivos. En cambio, en el caso del sistema continuo se observa una clara disminución de la intensidad con una gran absorbancia residual hacia mayores longitudes de onda (gráfica insertada en la Figura 5.20). Esto estaría indicando la agregación de las CuNp, lo cual coincide con los datos de DLS ya que no fue posible la determinación del tamaño de partícula por la presencia de agregados (Tabla 5.4).



**Figura 5.20. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor: AA. Temperatura 58°C. Espectros UV-vis de suspensiones obtenidas a través de sistema discontinuo de las condiciones DEc, duplicando (DEc x2) y triplicando (DEc x3) esas concentraciones y a través del sistema continuo de fase segmentada (x3) empleando  $r_q = 0,3/5$ .**

**Tabla 5.4. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo segmentado en micromezclador de canal recto. Reductor: AA. Precursor:  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ .** Temperatura 58°C. Tamaños de partículas. DEc: sistema discontinuo de las condiciones, DEc x2: duplicando concentraciones, DEc x3: triplicando concentraciones, sistema continuo de fase segmentada x3: triplicando concentraciones ( $r_q = 0,3/5$ ).

Muestra		Tamaño (nm)		SD	IPD
DEc	-	137,7	±	2,8	0,3
	x2	229,2	±	1,4	0,3
	x3	243,1	±	3,7	0,4
Fase segmentada	x3	-	±	-	-

Si bien, el sistema de flujo segmentado habría ayudado a controlar la nucleación y el crecimiento, esto no se refleja en los resultados de los espectros UV-vis y tamaño de partículas de las CuNp. Esto podría deberse a que con el objetivo de recuperar un volumen de muestra que se pueda caracterizar, las suspensiones de CuNp se recuperaron del frasco colector luego de 24 h del frasco colector. Durante ese tiempo podría haberse producido el proceso de “maduración de Ostwald” por el cual se produce la formación de partículas de gran tamaño a partir de la disolución de las más pequeñas [37]. Además resultó dificultoso recuperar la fase acuosa de la oleosa, quedando microgotas de aceite en la suspensión recuperada de CuNp. Esto generó interferencias en las medidas a la hora de evaluar tamaño hidrodinámico mediante DLS.

### 5.2.3. Síntesis de CuNp en sistema continuo de fase continua

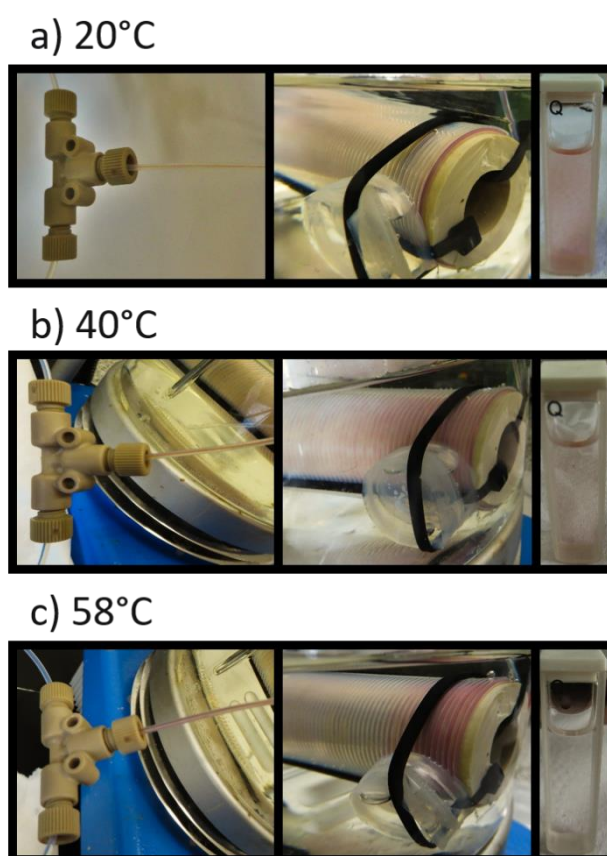
Debido a los inconvenientes a la hora de caracterizar las suspensiones obtenidas mediante sistema continuo segmentado se planteó la síntesis en un sistema de flujo continuo con micromezclador de teflón. En una jeringa se colocó la solución de Cu/PVP a pH = 5 y en la otra la solución de AA (Figura 5.21).



**Figura 5.21. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo continuo en micromezclador de teflón tipo “T”.** Fotografías digitales del sistema utilizado para la síntesis a distintas temperaturas.

A través del sistema con flujo continuo se evaluaron las condiciones DEc a tres temperaturas, 20, 40 y 58°C (Figura 5.22-a, b y c, respectivamente) con un tiempo de residencia de 10 min. Con fines comparativos, se sintetizaron CuNp mediante sistema discontinuo a 58°C con un tiempo de reacción de 10 min en las mismas condiciones DEc.

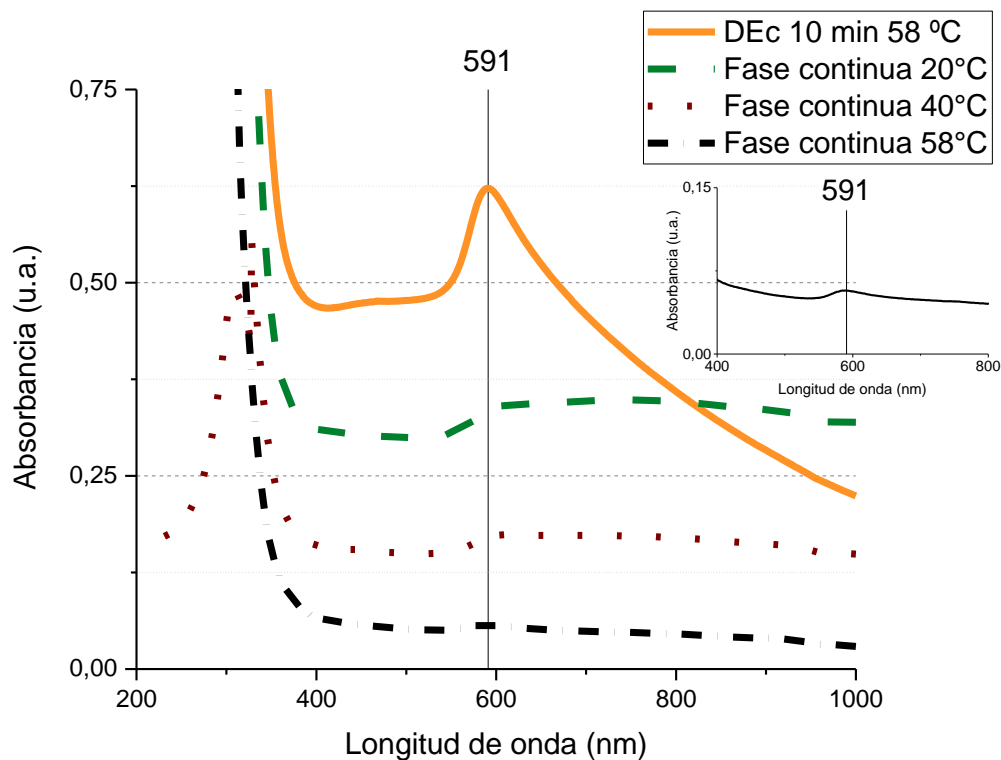
En el sistema continuo se observó que a mayor temperatura se produjo gran adherencia de Cu<sup>0</sup> sobre las paredes de la tubería generando una disminución de la intensidad de color en la suspensión recuperada (Figura 5.22).



**Figura 5.22. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo continuo en micromezclador de teflón tipo “T”.** Fotografías digitales del aspecto de las tuberías y las suspensiones obtenidas con las condiciones DEc a distintas temperaturas, a) 20°C, b) 40°C y c) 58°C.

A través del análisis de los espectros UV-vis (Figura 5.23) de las suspensiones obtenidas mediante régimen continuo se observa que el aumento de la temperatura, en general, conduce a una disminución de la intensidad, pero genera una disminución de la absorbancia a mayores longitudes de onda respecto del SPR. Este hecho coincide con la

disminución del diámetro hidrodinámico a medida que aumenta la temperatura (Tabla 5.5).



**Figura 5.23. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo continuo en micromezclador de teflón tipo “T”. Espectros UV-vis de las suspensiones obtenidas a distintas temperaturas: 20°C, 40°C y 58°C.**

**Tabla 5.5. Síntesis de CuNp en sistema continuo con flujo continuo en micromezclador de teflón tipo “T”. Tamaños de partículas de las suspensiones obtenidas a distintas temperaturas: 20°C, 40°C y 58°C.**

Muestra			Tamaño (nm)		SD	IPD
DEc	10 min	58°C	166,5	±	0,3	0,3
Fase continua	10 min	20°C	1411	±	19	0,3
		40°C	674,4	±	22,2	0,4
		58°C	358,4	±	6,1	0,3

Por último, estos resultados muestran que fue posible obtener y caracterizar CuNp mediante sistema continuo. Sin embargo al comparar con el sistema discontinuo, vemos que a 58°C gran parte del Cu reducido se pierde a través de la adherencia sobre la pared

de la tubería del microrreactor. Además las partículas obtenidas presentaron mayor diámetro hidrodinámico (358,4 y 166,5 nm, respectivamente, Tabla 4.5), lo cual se refleja en el SPR más ancho (Figura 5.23). Esto podría deberse a las características de los microrreactores, donde la distribución de la temperatura es más homogénea que en los sistemas discontinuos. Por lo tanto se hace más evidente su efecto sobre la reacción, donde la temperatura favorecería a la formación de  $\text{Cu}^0$ .

### 5.3. Conclusiones parciales

A través de un diseño estadístico de experimentos se estudió la influencia de la temperatura, la [PVP], la [AA] y el pH en la síntesis de CuNp con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  como precursor, AA como reductor y PVP como estabilizante.

Mediante el diseño experimental se lograron obtener CuNp con muy buena reproducibilidad y se concluyó que los factores más importantes son el pH y la temperatura de reacción. Se postula que ambos influyen sobre las propiedades del AA. Por un lado, un pH moderadamente ácido-básico incrementa el poder reductor del AA favoreciendo la formación de CuNp. En cambio, la temperatura afectaría la estabilidad del AA, de manera que a medida que aumenta disminuye su capacidad reductora. Además se comprobó la relación entre el tamaño de partículas y la señal de SPR, a mayor tamaño mayor longitud de onda del plasmón de resonancia.

Se lograron condiciones de síntesis que permiten obtener CuNp de tamaño intermedio, es decir detectables mediante espectroscopia UV-vis y que no forman precipitado de manera inmediata. Al comparar la evolución de la SPR en el tiempo, las más grandes resultaron más estables, mientras que las más pequeñas se habrían disuelto promoviendo el crecimiento de las partículas grandes.

Con las condiciones seleccionadas fue posible evaluar la síntesis en régimen continuo. Se evidenció que en este sistema, la microescala favorece la homogeneidad en la temperatura y la nucleación a concentraciones adecuadas de reactivos y estabilizantes. Al aumentar la temperatura aumenta la producción de nanopartículas, partes de las cuales se adhieren a las paredes del reactor (posiblemente por efecto electrostático o por adsorción). Este efecto se evita por la implementación de un sistema de fase segmentada, el cual a su vez logra un control de la nucleación y crecimiento de las

partículas en el interior de las microgotas. Sin embargo, las CuNp recuperadas de la fase acuosa se agregan y precipitan durante la recolección al final del proceso.

## 5.4. Bibliografía

1. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J., Bergman, R., *Experimental design and optimization*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **1998**. 42 (1): p. 3.
2. Vera Candioti, L., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C., *Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development*. Talanta, **2014**. 124: p. 123.
3. Wu, S., *Preparation of fine copper powder using ascorbic acid as reducing agent and its application in MLCC*. Materials Letters, **2007**. 61 (4): p. 1125.
4. Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., Wu, X., *Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid*. Green Chemistry, **2011**. 13 (4): p. 900.
5. Komeily-Nia, Z., Montazer, M., Latifi, M., *Synthesis of nano copper/nylon composite using ascorbic acid and CTAB*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2013**. 439: p. 167.
6. Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., Rafique, M.S., Imran, M., *A green method for the synthesis of copper nanoparticles using L-ascorbic acid*. Matéria (Rio de Janeiro), **2014**. 19: p. 197.
7. Moshalagae Motlatle, A., Kesavan Pillai, S., Rudolf Scriba, M., Sinha Ray, S., *Chemical synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial properties of Cu and its oxide nanoparticles*. Journal of Nanoparticle Research, **2016**. 18 (10): p. 312.
8. Zain, N.M., Stapley, A.G., Shama, G., *Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications*. Carbohydrate Polymers, **2014**. 112: p. 195.
9. Zhang, Y., Zhu, P., Li, G., Zhao, T., Fu, X., Sun, R., Zhou, F., Wong, C.-p., *Facile preparation of monodisperse, impurity-free, and antioxidation copper nanoparticles on a large scale for application in conductive ink*. ACS Applied Materials & Interfaces, **2014**. 6 (1): p. 560.
10. Chang, S.K., Ismail, A., Daud, Z.A.M., *Ascorbic acid: Properties, determination and uses*. Encyclopedia of Food and Health, Editores: B. Caballero, P.M. Finglas, y F. Toldrá. **2016**, Academic Press: Oxford. p. 275.
11. Zhang, W., Luan, C., Yang, Z., Liu, X., Zhang, D., Yang, S., *Preparation and optical properties of Cu<sub>2</sub>O hollow microsphere film and hollow nanosphere powder via a simple liquid reduction approach*. Applied Surface Science, **2007**. 253 (14): p. 6063.
12. Pedersen, D.B., Wang, S., Liang, S.H., *Charge-transfer-driven diffusion processes in Cu@Cu-oxide core-shell nanoparticles: Oxidation of 3.0 ± 0.3 nm diameter copper nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, **2008**. 112 (24): p. 8819.

13. Salavati-Niasari, M., Davar, F., *Synthesis of copper and copper(I) oxide nanoparticles by thermal decomposition of a new precursor*. Materials Letters, **2009**. 63 (3): p. 441.
14. Hassan, M.S., Amna, T., Yang, O.B., El-Newehy, M.H., Al-Deyab, S.S., Khil, M.S., *Smart copper oxide nanocrystals: synthesis, characterization, electrochemical and potent antibacterial activity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2012**. 97: p. 201.
15. Shi, M., Kwon, H.S., Peng, Z., Elder, A., Yang, H., *Effects of surface chemistry on the generation of reactive oxygen species by copper nanoparticles*. ACS Nano, **2012**. 6 (3): p. 2157.
16. Tokarek, K., Hueso, J.L., Kuśtrowski, P., Stochel, G., Kyzioł, A., *Green synthesis of chitosan-stabilized copper nanoparticles*. European Journal of Inorganic Chemistry, **2013**. 2013 (28): p. 4940.
17. Khanehzaei, H., Ahmad, M.B., Shameli, K., Ajdari, Z., *Synthesis and characterization of Cu@Cu<sub>2</sub>O core shell nanoparticles prepared in seaweed Kappaphycus alvarezii media*. International Journal of Electrochemical Science, **2014**. 9: p. 8189.
18. Yuan, J.-P., Chen, F., *Degradation of ascorbic acid in aqueous solution*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1998**. 46 (12): p. 5078.
19. Sheraz, M., Khan, M., Ahmed, S., Hafeez Kazi, S., Ahmed, I., *Stability and stabilization of ascorbic acid*. Household and Personal Care Today, **2015**. 10: p. 20.
20. Dang, T.M.D., Le, T.T.T., Fribourg-Blanc, E., Dang, M.C., *The influence of solvents and surfactants on the preparation of copper nanoparticles by a chemical reduction method*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, **2011**. 2 (2): p. 025004.
21. Begletsova, N., Selifonova, E., Chumakov, A., Al-Alwani, A., Zakharevich, A., Chernova, R., Glukhovskoy, E., *Chemical synthesis of copper nanoparticles in aqueous solutions in the presence of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2018**. 552: p. 75.
22. Lisiecki, I., Billoudet, F., Pileni, M.P., *Control of the Shape and the Size of Copper Metallic Particles*. The Journal of Physical Chemistry, **1996**. 100 (10): p. 4160.
23. Barker, T.B., Milivojevic, A., *Quality by experimental design*. 4th ed. **2016**, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300: Chapman and Hall/CRC 724.
24. Araki, T., Sugahara, T., Jiu, J., Nagao, S., Nogi, M., Koga, H., Uchida, H., Shinozaki, K., Suganuma, K., *Cu salt ink formulation for printed electronics using photonic sintering*. Langmuir, **2013**. 29 (35): p. 11192.
25. Mahl, D., Diendorf, J., Meyer-Zaika, W., Eppele, M., *Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of*



*metallic nanoparticles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **2011**. 377 (1): p. 386.

26. Johansson, I., Svensson, M., *Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, **2001**. 6 (2): p. 178.

27. Baret, J.-C., *Surfactants in droplet-based microfluidics*. Lab on a Chip, **2012**. 12 (3): p. 422.

28. Dreyfus, R., Tabeling, P., Willaime, H., *Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels*. Physical Review Letters, **2003**. 90 (14): p. 144505.

29. Garstecki, P., Fuerstman, M.J., Stone, H.A., Whitesides, G.M., *Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up*. Lab on a Chip, **2006**. 6 (3): p. 437.

30. Zhang, J., Coulston, R.J., Jones, S.T., Geng, J., Scherman, O.A., Abell, C., *One-step fabrication of supramolecular microcapsules from microfluidic droplets*. Science, **2012**. 335 (6069): p. 690.

31. Wang, X., Riaud, A., Wang, K., Luo, G., *Pressure drop-based determination of dynamic interfacial tension of droplet generation process in T-junction microchannel*. Microfluidics and Nanofluidics, **2015**. 18 (3): p. 503.

32. Nakama, Y., *Surfactants*. Cosmetic Science and Technology, Editores: K. Sakamoto, y col. **2017**, Elsevier: Amsterdam. p. 231.

33. Günther, A., Jensen, K.F., *Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis*. Lab on a Chip, **2006**. 6 (12): p. 1487.

34. Shahmiri, M., Azowa Ibrahima, N.O.R., Zainuddina, N., Asim, N., Bakhtyarb, B., Zaharimb, A., Sopianb, K., *Effect of pH on the synthesis of CuO nanosheets by quick precipitation method*. WSEAS Transactions on Environment and Development, **2013**. 9 (2).

35. Burriel Marti, F., Lucena Conde, F., Arribas Jimeno, S., Hernandez Medez, J., *Química analítica cualitativa*. 16° ed. **1974**.

36. LaMer, V.K., Dinegar, R.H., *Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols*. Journal of the American Chemical Society, **1950**. 72 (11): p. 4847.

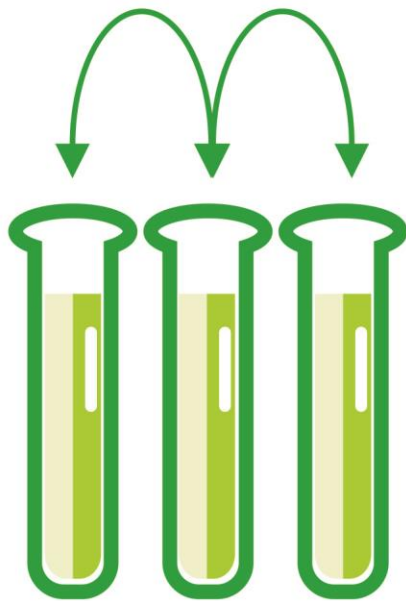
37. Miguel García, I., *Nanopartículas de Pd para su aplicación en catálisis y en sistemas de detección de H<sub>2</sub>*. Tesis Doctoral. **2013**. Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alicante.



## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



## 6. ACTIVIDAD BACTERICIDA



## Capítulo 6 : Actividad bactericida

---

Este capítulo se basa en la aplicación bactericida de las nanopartículas de plata (AgNp) y cobre (CuNp) sintetizadas. La actividad bactericida de las nanopartículas analizadas en los capítulos anteriores se evaluó contra cultivos *Escherichia coli* mediante el método de dilución y recuento en placa. En primera instancia se presenta el análisis de las AgNp obtenidas empleando glucosa como agente reductor. Luego se analizan las actividades bactericidas de las CuNp sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  y dopamina (DOPA).

Debido a que se encuentra ampliamente reportado que el efecto bactericida de las AgNp y CuNp se debe a la presencia de iones de plata y cobre [1-7], el objetivo es lograr una liberación controlada de los iones para obtener una actividad prolongada en el tiempo. Por este motivo se estudió el efecto reservorio de las nanopartículas comparando su actividad respecto de sus sales precursoras.

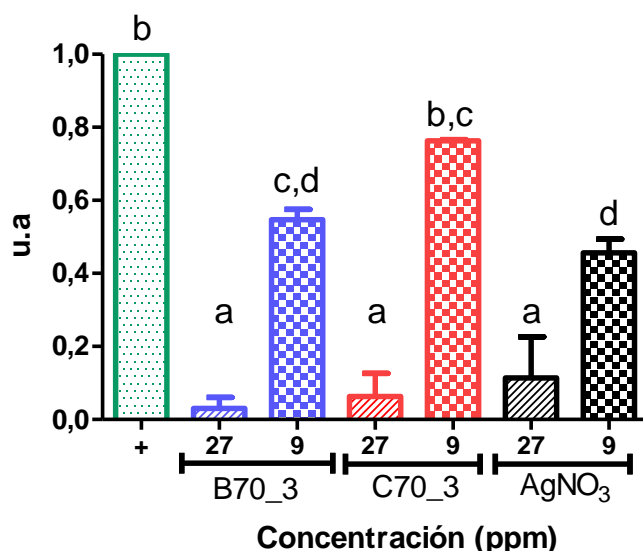
### 6.1. Actividad bactericida AgNp

A partir de los resultados del Capítulo 3, las muestras sintetizadas a 70°C con una relación molar Ag/glucosa  $r = 1/5$  (en condiciones discontinuas o continuas) almacenadas durante 8 meses dieron la mejor respuesta óptica y morfológica en términos de reproducibilidad y estabilidad; en consecuencia, fueron seleccionadas para realizar ensayos bactericidas contra *E. coli*.

Debido al tamaño muy pequeño de las AgNp obtenidas, no fue posible separarlas de la suspensión. Además, se sabe que el medio de cultivo de bacterias podría afectar la actividad antimicrobiana de la plata [8]. En este contexto, la respuesta bactericida de las AgNp se evaluó sin lavar las suspensiones. Las muestras se diluyeron hasta concentraciones de Ag finales de 9 y 27 ppm y se utilizaron soluciones acuosas de  $\text{AgNO}_3$  con concentraciones idénticas como controles.

La Figura 6.1 resume los efectos de las diferentes concentraciones de plata (9 y 27 ppm) de cada muestra sobre un cultivo de *E. coli* después de 20 h de incubación. La concentración de bacterias se expresa en unidades formadoras de colonia (CFU, del inglés *colony forming units*) y se normalizó con la concentración de *E. coli* de la muestra del control positivo (+, en ausencia de Ag). Cada experimento se realizó por triplicado.

Los resultados se ajustan dentro del rango reportado en la literatura de la concentración mínima inhibitoria (MIC, del inglés *minimal inhibitory concentration*) para AgNp alrededor de 0,5-50 ppm [9].



**Figura 6.1. Actividad bactericida de las AgNp sintetizadas mediante sistema discontinuo (B70\_3) y continuo (C70\_3) y AgNO<sub>3</sub> utilizado como control. Concentración de plata: 9 y 27 ppm. Las letras indican diferencia significativa entre los grupos (test de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )**

De acuerdo con el análisis estadístico, las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos. Todas las muestras mostraron diferencias significativas en comparación con el control positivo (+), a excepción de la muestra C70\_3 con 9 ppm de plata. Mientras que las muestras con 27 ppm de plata no mostraron diferencias significativas, independientemente del tipo de muestra o el método de preparación. Por otro lado, cuando la concentración total de plata fue de 9 ppm, la actividad bactericida de AgNO<sub>3</sub> fue ligeramente mayor en comparación con la obtenida para las AgNp.

Debido a que la actividad bactericida de las AgNp se relaciona principalmente a la presencia de iones de plata [1, 2], deben considerarse muchos factores para analizar su actividad. Estos factores incluyen tanto sobre los parámetros que promueven la liberación de Ag<sup>+</sup> desde las partículas y su biodisponibilidad, como el tamaño de partícula, concentración, funcionalización, velocidad de oxidación, temperatura y composición de los medios de cultivo [1, 2, 8, 10, 11].

En el primer caso (27 ppm de plata), los datos sugieren que existe una conexión entre los tamaños de partícula y la actividad bactericida. A pesar de que las partículas C70\_3 resultaron más pequeñas (tamaño promedio 3,74 nm) que B70\_3 (tamaño medio 12,90 nm), B70\_3 presentó una distribución de tamaños considerablemente mayor (desviación estándar 12,6 nm), donde más del 50% de las partículas fueron menores a 10 nm (Figura 3.6). Por lo tanto, las partículas de B70\_3 y C70\_3 podrían considerarse lo suficientemente pequeñas como para disolverse por completo como  $\text{Ag}^+$ , mostrando una toxicidad similar al  $\text{AgNO}_3$ . Existen fuertes evidencias que apoyan que la respuesta bactericida es mayor cuando las AgNp son más pequeñas, debido a que su elevada relación de área/volumen genera un reservorio de iones plata en la superficie de nanopartículas fácilmente disponibles tras la disolución en los medios de cultivo [1]. Lalueza y col. [2] afirman que el efecto bactericida depende de la biodisponibilidad de los iones de plata; cuanto más disponible, mejores son las propiedades biocidas del material de plata. En su trabajo, las nanopartículas con tamaños promedio alrededor de 100 nm no mostraron un efecto bactericida significativo en comparación con  $\text{AgNO}_3$ , lo que sugiere un efecto bactericida despreciable por parte de nanopartículas grandes y estables.

En el segundo caso (9 ppm de plata), es importante considerar que los medios de cultivo no se diluyeron y que todas las muestras se expusieron a las mismas composiciones de cultivo con alto contenido de materia orgánica (extractos de peptona y levadura). En este marco, Zhang y col. [8] estudiaron la dispersión de AgNp en diferentes medios y su correspondiente actividad bactericida. Observaron que la liberación de  $\text{Ag}^+$  es sensible a la composición del medio y sugieren que la presencia de material orgánico podría cubrir la superficie de AgNp e inhibir la disolución de las partículas. En consecuencia, podríamos proponer la hipótesis de que cuando la concentración de nanopartículas es baja, el efecto de revestimiento de la materia orgánica podría ser más importante, retardando la disolución de la partícula y generando un reservorio de  $\text{Ag}^+$ . Sin embargo, estas investigaciones se deben profundizar para corroborar esta especulación.

Estos resultados concuerdan con las evidencias reportadas sobre la influencia del tamaño de partícula y la composición del medio sobre la actividad bactericida de las

AgNp. Aún más, fue posible corroborar que los productos químicos de la síntesis de las AgNp (glucosa y almidón) no interfieran en la toxicidad de las nanopartículas.

## 6.2. Actividad bactericida CuNp

En el caso de las CuNp, de los cuatro tipos de protocolos evaluados, se evaluaron las partículas sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  y DOPA, que se analizan a continuación por separado.

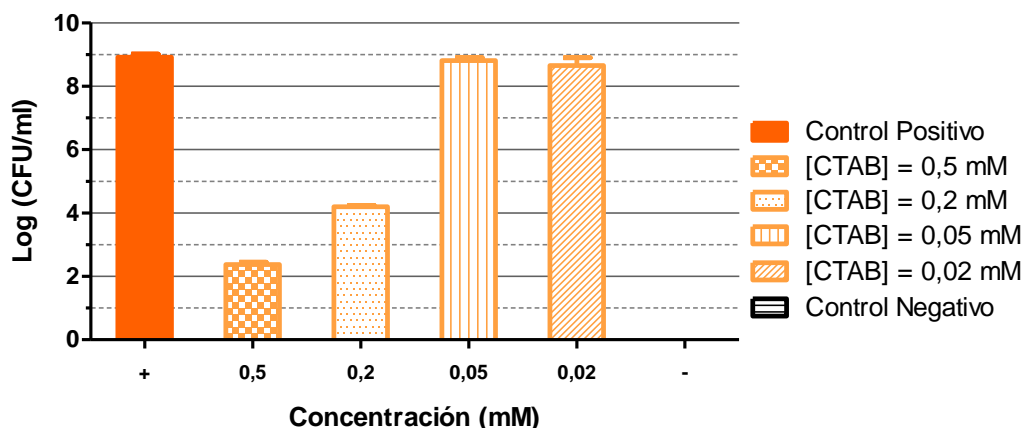
### 6.2.1. Reductor $\text{NaH}_2\text{PO}_2$

Las CuNp sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  como agente reductor (Capítulo 4.2) se mantuvieron estables en suspensión por la presencia de los agentes estabilizantes, cetiltrimetilamonio (CTAB) y polivirrolidona (PVP). Sin embargo, el CTAB es un surfactante catiónico que presenta actividad antimicrobiana [12, 13]. Como consecuencia, para analizar la actividad bactericida fue necesario realizar un blanco de reactivos para poder determinar que concentración de CuNp analizar sin que se observara el efecto tóxico del CTAB y atribuir el efecto biocida exclusivamente a las nanopartículas.

A partir de los resultados del Capítulo 4.2 se procedió a evaluar la suspensión de CuNp obtenidas con una concentración final de CTAB ([CTAB]) de 25 mM (Figuras 4.7 y 4.8, Capítulo 4.2). De esta manera se realizó un ensayo evaluando la viabilidad bacteriana en presencia de concentraciones de [CTAB] de 0,5 – 0,2 – 0,05 y 0,02 mM en un cultivo de  $10^6$  CFU/mL. En paralelo se realizaron el control positivo con un cultivo de  $10^6$  CFU/mL, y el control negativo con medio de cultivo sin bacterias. Los resultados se muestran en la Figura 6.2.

De este ensayo se observó que un cultivo conteniendo CTAB con concentraciones 0,05 y 0,02 mM crece hasta concentración similar al control positivo.





**Figura 6.2. Ensayo control para evaluar la toxicidad inherente del CTAB.** Concentraciones CTAB: [CTAB] = 0,5 – 0,2 – 0,05 y 0,02 mM. Concentración *E.coli*:  $10^6$  CFU/mL. Control positivo: +,  $10^6$  CFU/mL). Control negativo: -, sin bacterias.

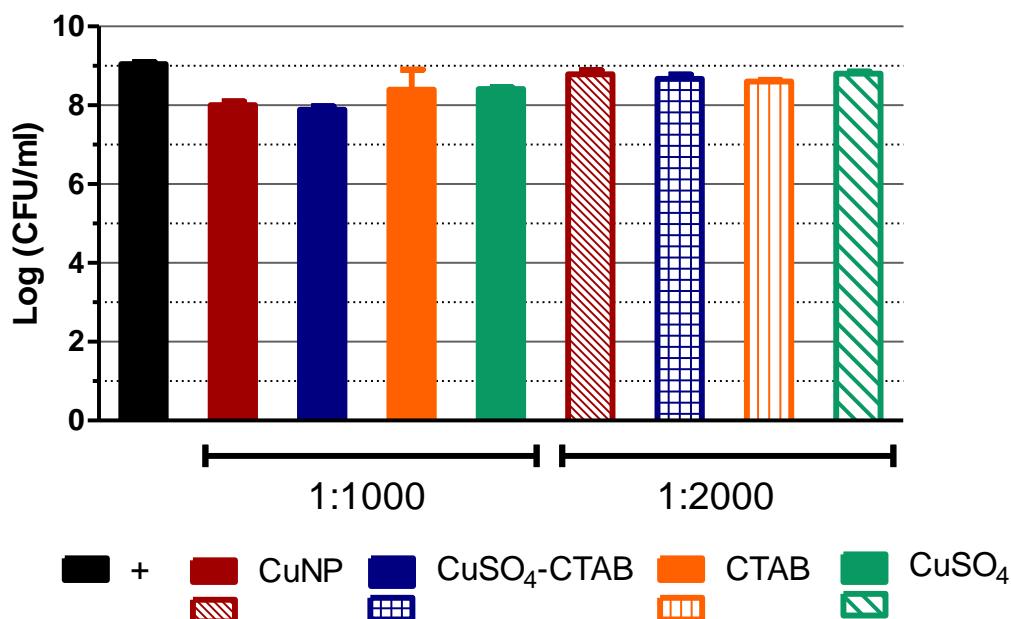
Teniendo en cuenta que en la suspensión la concentración de cobre y CTAB son 50 mM y 25 mM, respectivamente, y a partir de los datos del ensayo control de CTAB; se plantearon dos diluciones, 1:1000 y 1:2000. Así las [CTAB] finales en el medio de cultivo fueron 0,025 mM y 0,0125 mM. Además se evaluó, una disolución de  $\text{CuSO}_4$  para poder comparar el poder bactericida entre las CuNp y los iones de Cu disueltos; y una disolución de  $\text{CuSO}_4$ -CTAB, para evaluar si existe un posible efecto sinérgico entre el cobre y el CTAB. En la Tabla 6.1 se resumen los diferentes grupos evaluados y las concentraciones finales de Cu y CTAB.

**Tabla 6.1. Ensayos bactericidas con CuNp de CuNp sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ .** Concentración (mM) de Cu y CTAB en los diferentes grupos evaluados frente a *E. coli*.

	1:1000		1:2000	
	[Cu] (mM)	[CTAB] (mM)	[Cu] (mM)	[CTAB] (mM)
CuNp	0,05	0,025	0,025	0,0125
$\text{CuSO}_4$ -CTAB	0,05	0,025	0,025	0,0125
CTAB	-	0,025	-	0,0125
$\text{CuSO}_4$	0,05	-	0,025	-

La Figura 6.3 muestra los resultados de actividad antibacteriana para cada una de las muestras enfrentadas a un cultivo de *E. coli* durante 20 h a 37 °C. En la gráfica se observa que las muestras de CuNp y  $\text{CuSO}_4$ -CTAB diluidas 1:1000 presentan una disminución de un logaritmo respecto al control positivo. Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas (test de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) respecto a los controles con CTAB e incluso  $\text{CuSO}_4$ . Es decir que los resultados no fueron concluyentes para poder evaluar y

comprobar la actividad antibacteriana de las CuNp sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  en presencia de CTAB. Se podrían haber evaluado las suspensiones de CuNp obtenidas con menor [CTAB] (Figuras 4.11 y 4.12, Capítulo 4.2), sin embargo se decidió continuar con una suspensión preparada con reactivos que no presenten actividad bactericida por sí mismos y cuya síntesis sea compatibles con el ambiente.



**Figura 6.3. Ensayo bactericida de CuNp sintetizadas con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ .** Control Positivo: +,  $10^6$  CFU/ml. CuNp: suspensión de CuNp.  $\text{CuSO}_4$ -CTAB: solución de sal de Cu y CTAB. CTAB: solución de CTAB.  $\text{CuSO}_4$ : solución de sal de Cu. Diluciones: 1:1000 1:2000.

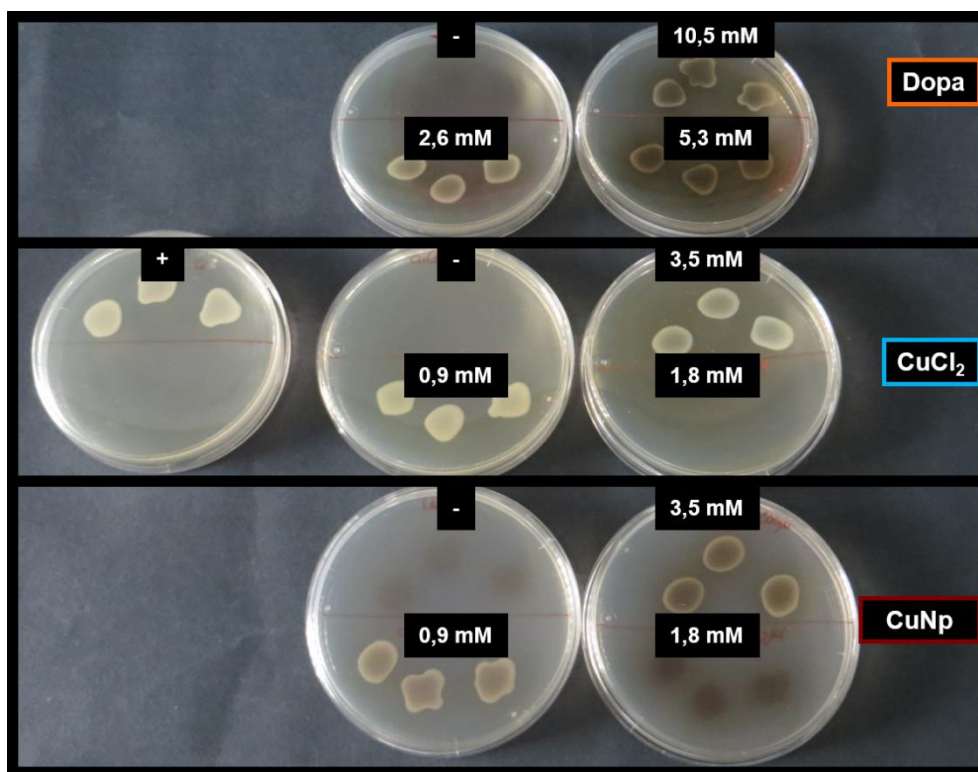
### 6.2.2. Reductor dopamina

En vista a la dificultad de determinar la actividad bactericida de las CuNp debido a la presencia de CTAB, también se evaluaron las partículas obtenidas con DOPA.

Las CuNp preparadas mediante el protocolo original presentaron una concentración final de Cu y DOPA de 0,05 M y 0,15 M, respectivamente (Figura 4.34, Capítulo 4.4).

Primero se estudiaron cualitativamente tres concentraciones finales de cobre diferentes (3,5 – 1,8 y 0,88 mM) y DOPA (10,5 – 5,3 y 2,6 mM) frente al cultivo de *E. coli* ( $10^6$  CFU/ml) para calcular la concentración necesaria para evaluar mediante recuento en placa. En la Figura 6.4 se muestran los resultados después de 20 h de incubación. El control positivo consistió en medios cultivados con bacterias (+) y los controles

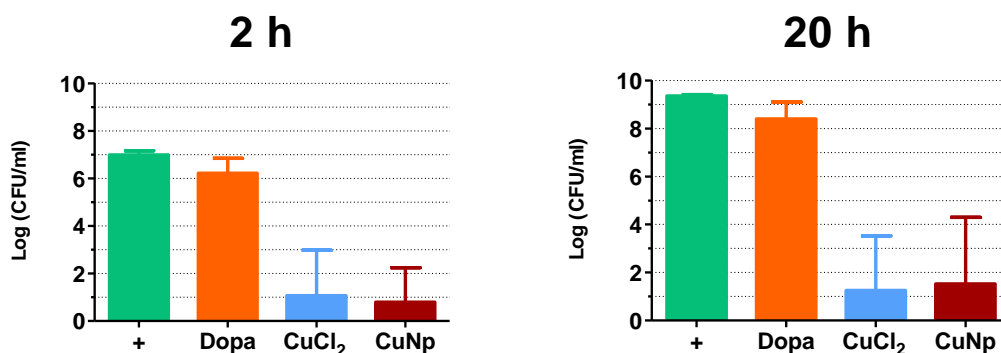
negativos se cultivaron en medios con CuNp, CuCl<sub>2</sub> o DOPA (-). A partir de estos resultados, podemos observar que la DOPA no presenta actividad bactericida en las concentraciones evaluadas. Mientras que las CuNp y el CuCl<sub>2</sub> resultaron bactericidas en una concentración de 3,5 mM.



**Figura 6.4. Ensayo cualitativo de la actividad bactericida de las CuNp sintetizadas con DOPA.** Fotografías digitales de cultivos de *E. coli* 10<sup>6</sup> CFU/ml incubados a 37°C 20 h. +: medio de cultivo de *E. coli*. DOPA: solución de DOPA, CuCl<sub>2</sub>: solución de sal de Cu, CuNp: suspensión de nanopartículas. -: medio de cultivo sin bacterias con las respectivas muestras de DOPA, CuNp y CuCl<sub>2</sub>.

Para estudiar la diferencia entre la sal precursora y las nanopartículas y el efecto reservorio, se enfrentaron medios de cultivo de *E. coli* (10<sup>6</sup> CFU/ml) con soluciones de CuCl<sub>2</sub> y CuNp durante 2 y 20 h de incubación. A partir del análisis de la Figura 6.4, se seleccionó como concentración final de Cu de 1,8 mM, y por lo tanto 5,3 mM de DOPA.

De la gráfica de la Figura 6.5 Una vez más, se comprueba que la DOPA no presenta actividad bactericida ya que el cultivo alcanza concentraciones similares al control positivo (+) tanto a las 2 h como a las 20 h. Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre la actividad bactericida de la sal cobre y las CuNp.



**Figura 6.5. Ensayo bactericida de CuNp sintetizadas con DOPA.** Gráfica del logaritmo CFU/ml obtenido luego de enfrentar las diferentes muestras a un cultivo de *E. coli* 10<sup>6</sup> CFU/ml a 37°C durante 2h y 20 h. +: medio de cultivo de *E. coli*. DOPA: solución de DOPA (5,3 mM), CuCl<sub>2</sub>: solución de sal de Cu (1,8 mM), CuNp: suspensión de nanopartículas (1,8 mM).

Este resultado sugiere que las CuNp se encontrarían completamente disueltas en el medio de cultivo y actuarían del mismo modo que los iones Cu<sup>2+</sup> de la sal precursora.

Las CuNp sintetizadas con DOPA como agente reductor resultaron partículas muy pequeñas entre 2 y 10 nm de diámetro (Figura 4.36, Capítulo 4.4). Esta elevada relación de área superficial/volumen habría incrementado la interacción con la materia orgánica del medio de cultivo, favoreciendo la disolución de las partículas y la liberación de Cu<sup>2+</sup> [14]. Ruparelia y col. [7] evaluaron la liberación de Cu<sup>2+</sup> y Ag<sup>+</sup> en medio de cultivo a partir de suspensiones de CuNp y AgNp. Observaron que los nutrientes del medio facilitaron la disolución de las partículas, siendo mayor el grado de disolución de las CuNp.

Finalmente, se pudo evaluar la actividad bactericida de las CuNp sin interferencias por parte de los productos de la síntesis. Y al igual que con las AgNp, los resultados coinciden con los trabajos publicados sobre la relación del tamaño de partícula y el grado de disolución en los medios de cultivos.

### 6.3. Conclusiones parciales

Se evaluó la actividad bactericida de AgNp y CuNp contra cultivos de *E. coli* comparando con cada una con las sales precursoras correspondientes con el objetivo de lograr un efecto reservorio que permita la liberación controlada de iones metálicos.

En ambas las nanopartículas mostraron tener actividad bactericida, sin embargo no presentaron diferencias significativas respecto de las sales.

Por lo tanto se concluye que, debido a que en ambos casos las partículas resultaron muy pequeñas, estas se disuelven completamente en el medio de cultivo liberando inmediatamente iones metálicos actuando de la misma manera que las sales precursoras.

## 6.4. Bibliografía

1. Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., Holecová, M., Zbořil, R., *Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs)*. The Journal of Physical Chemistry C, **2008**. 112 (15): p. 5825.
2. Lalueza, P., Monzón, M., Arruebo, M., Santamaría, J., *Bactericidal effects of different silver-containing materials*. Materials Research Bulletin, **2011**. 46 (11): p. 2070.
3. Delgado, K., Quijada, R., Palma, R., Palza, H., *Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent*. Letters in Applied Microbiology, **2011**. 53 (1): p. 50.
4. Kruk, T., Szczepanowicz, K., Stefanska, J., Socha, R.P., Warszynski, P., *Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **2015**. 128: p. 17.
5. Wang, L., Hu, C., Shao, L., *The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future*. International Journal of Nanomedicine, **2017**. 12: p. 1227.
6. Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O., Bach, H., *Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity*. Journal of Nanobiotechnology, **2017**. 15 (1): p. 65.
7. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S., *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. Acta Biomaterialia, **2008**. 4.
8. Zhang, H., Smith, J.A., Oyanedel-Craver, V., *The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers*. Water Research, **2012**. 46 (3): p. 691.
9. Chowdhury, N.R., MacGregor-Ramiasa, M., Zilm, P., Majewski, P., Vasilev, K., *'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity*. Journal of Colloid and Interface Science, **2016**. 482: p. 151.
10. Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Köller, M., Epple, M., *Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions*. Chemistry of Materials, **2010**. 22.
11. Odzak, N., Kistler, D., Behra, R., Sigg, L., *Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media*. Environmental Pollution, **2014**. 191: p. 132.
12. Simões, M., Pereira, M.O., Vieira, M.J., *Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes*. Water Research, **2005**. 39 (2): p. 478.

13. Nakata, K., Tsuchido, T., Matsumura, Y., *Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in Escherichia coli cells.* Journal of Applied Microbiology, **2011**. 110 (2): p. 568.
14. Wang, L.-F., Habibul, N., He, D.-Q., Li, W.-W., Zhang, X., Jiang, H., Yu, H.-Q., *Copper release from copper nanoparticles in the presence of natural organic matter.* Water Research, **2015**. 68: p. 12.





## MICRORREACTORES CONTINUOS

---

UNA ALTERNATIVA PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CON APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN Y EL CONTROL AMBIENTAL.



## 7.CONCLUSIONES



## Capítulo 7 : Conclusiones y perspectivas

---

### 7.1. Conclusiones

#### 7.1.1. Contexto

En este trabajo de tesis se presentan diferentes métodos de síntesis en microrreactores continuos de distintas geometrías y se compararon con el método discontinuo convencional tomando como referencia los protocolos reportados en bibliografía, priorizando la química “verde”, y ajustando los parámetros involucrados en los procesos con el fin de optimizar los rendimientos y las características fisicoquímicas del material sintetizado. Se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNp) y cobre (CuNp) debido a sus propiedades bactericidas que le confieren gran potencial para aplicaciones en remediación y control ambiental.

#### 7.1.2. Nanopartículas de plata

Se logró la síntesis de nanopartículas coloidales esféricas con excelentes características en términos de reproducibilidad y estabilidad siguiendo un protocolo de síntesis verde a través de ambos sistemas, discontinuo y continuo. El sistema continuo arrojó los mejores resultados en comparación con la síntesis en discontinuo con tiempos de residencia de reacción mucho menores; y se obtuvo una distribución de tamaño de nanopartículas más estrecha. El uso combinado de reactivos verdes, como la glucosa y almidón, condujo a la obtención de AgNp de gran estabilidad. La presencia de almidón resulta crucial para garantizar la estabilidad de AgNp en la suspensión. La principal contribución de este trabajo es el análisis del comportamiento de las suspensiones de AgNp obtenidas con ambas disposiciones y diferentes condiciones de reacción después de un almacenamiento a largo plazo (48 meses) sin protección de la luz.

#### 7.1.3. Nanopartículas de cobre

Las CuNp resultan partículas inestables debido a fenómenos de agregación, precipitación y oxidación durante el proceso de preparación o de almacenamiento.

Tendiendo a salvar esta inestabilidad, se evaluaron cuatro agentes reductores:  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{N}_4$ , dopamina (DOPA) y ácido ascórbico (AA). Tanto  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  y como  $\text{H}_2\text{N}_4$  son reductores fuertes y se obtienen partículas estables. Mientras que DOPA y AA se

proponen como reactivos compatibles con el ambiente, sin embargo son reductores más débiles y sensibles a la temperatura.

Se concluyó que el tipo de sal precursora influye en la velocidad de reacción afectando los procesos de nucleación y crecimiento. Se establece que para la reacción de reducción con  $\text{N}_2\text{H}_4$  las velocidades de formación de partículas resultan  $\text{CuCl}_2 \gg \text{CuSO}_4 \gg \text{Cu}(\text{NO}_3)_2 > \text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , siendo más estables las CuNp obtenidas con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Lo mismo sucede con el AA, que a su vez se ve afectado por el pH final de las soluciones. De esta manera, empleando  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  la solución alcanza un pH moderadamente ácido que favorece la reacción de reducción logrando la formación de CuNp. En cambio, con DOPA el tipo de precursor utilizado no significó una influencia importante, probablemente debido a que la inestabilidad térmica de la DOPA es la variable más importante en la formación de las CuNp.

En la síntesis con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  en medio orgánico se comprobó que el CTAB y el PVP ejercen funciones estabilizantes protegiendo las partículas de la oxidación superficial y la agregación. En este caso, la fuerza iónica del medio es un factor importante dado que las partículas se estabilizan tanto por efectos estéricos como electrostáticos. En cambio, al utilizar  $\text{N}_2\text{H}_4$  en medio acuoso el aumento de la [PVP] no genera una disminución del precipitado. Es decir que para estabilizar las CuNp sería necesario un sistema con dos estabilizantes. Sin embargo, el CTAB no es un reactivo compatible con el ambiente y además como surfactante catiónico interfiere en la determinación de la actividad bactericida de las CuNp.

En vista de estas conclusiones, se deduce que la síntesis de CuNp estables requiere el control simultáneo de numerosas variables. Por lo tanto, se propuso un diseño experimental para evaluar diferentes factores de manera simultánea sobre la síntesis con  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y AA. De esta manera se obtuvieron CuNp con muy buena reproducibilidad y se concluyó que los factores más importantes son el pH y la temperatura de reacción. Se postula que ambos influyen sobre las propiedades del AA. Por un lado, un pH moderadamente ácido-básico incrementa el poder reductor del AA y favoreciendo la formación de CuNp. En cambio, la temperatura afectaría la estabilidad del AA, de manera que a medida que aumenta disminuye su capacidad reductora.

Además se comprobó la relación entre el tamaño de partículas y la señal de SPR, a mayor tamaño mayor longitud de onda del plasmón de resonancia. Se lograron condiciones de síntesis que permiten obtener CuNp de tamaño adecuado, es decir detectables mediante espectroscopia UV-vis y que no forman precipitado de manera inmediata. A su vez, al comparar dos muestras de CuNp con partículas con diferentes diámetro medio se concluyó que las más grandes resultaron más estables, mientras que las más pequeñas se habrían disuelto y formado partículas más grandes.

Los microrreactores de fase continua con micromezclador de teflón se utilizaron para las síntesis con  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$ , DOPA y AA. En el primer caso, se lograron CuNp estables y se concluyó que la temperatura y el tipo de configuración conllevan a una disminución del tiempo de residencia. A su vez, el sistema continuo da lugar a una mayor concentración de partículas. Por otro lado, con DOPA y AA, la distribución homogénea de la temperatura en el interior de los microreactores provoca diferentes efectos. En el caso de la DOPA provocaría su inactivación térmica impidiendo la reducción de los iones de Cu. En cambio, con AA la reacción de reducción se vería favorecida y generándose la adherencia de  $\text{Cu}^0$  sobre las paredes de la tubería.

Los microreactores de fase segmentada con micromezcladores de acrílico se emplearon para las síntesis con  $\text{N}_2\text{H}_4$  y AA con el objetivo de controlar la nucleación y el crecimiento de las partículas y evitar la adherencia de Cu sobre las paredes de las tuberías. En primer lugar, se logró la formación y el control de tamaño de las microgotas en función de la relación de caudales. En segundo lugar, con ambos reductores se logró la formación de CuNp, sin embargo presentaron tamaño promedio mayor y una menor estabilidad respecto a las sintetizadas en régimen discontinuo. En el caso de  $\text{N}_2\text{H}_4$ , se atribuye a dos motivos: (i) al régimen de gotas no homogéneo, debido a la diferencia de diámetro interno entre el canal del micromezclador utilizado y la tubería de salida y a la formación de burbujas por la liberación de  $\text{N}_2$  de la reacción de reducción; y (ii) al tiempo de reposo de la suspensión recolectada de manera estanca, donde las partículas se agregan y precipitan. En el caso del AA, a pesar de que las partículas se aglomeran debido al tiempo de reposo durante la recuperación, se logra finalmente el control de la nucleación y el crecimiento debido al cambio de la geometría del micromezclador.

### 7.1.4. Conclusiones finales

Se logró la síntesis de AgNp y CuNp mediante síntesis en continuo y con protocolos ambientalmente benignos.

La síntesis de CuNp significó un gran desafío debido a la inestabilidad propia del Cu. Sin embargo, se logró llegar al producto deseado a través de un estudio sistemático de las variables que afectan su preparación.

Los microrreactores mostraron ser una herramienta versátil, que se diseñan y adaptan de acuerdo a las condiciones de síntesis necesarias para obtener el producto deseado. A pesar de que en ambos sistemas se establecieron las mismas condiciones, mediante el continuo hay factores adicionales a tener en cuenta a la hora de sintetizar nanomateriales.

En ambos casos las nanopartículas mostraron tener actividad bactericida contra cultivos de *E. coli*, presentando la misma actividad que sus respectivas sales precursoras.

## 7.2. Perspectivas

A partir de las conclusiones obtenidas se propone:

- Evaluar diferentes formas de recuperación de las nanopartículas sintetizadas con microrreactores de fase segmentada con el objetivo de evitar la aglomeración y precipitación.
- Emplear los microrreactores de fase segmentada para análisis in situ de la formación de las nanopartículas y poder estudiar en detalle la cinética de formación.
- Evaluar la actividad bactericida de las CuNp obtenidas con AA, para comprobar que un aumento del tamaño medio de partículas genera un reservorio de iones logrando una respuesta sostenida en el tiempo.
- Sintetizar AgNp de mayor tamaño para mejorar la calidad de reservorio de iones con fines bactericidas.
- Inmovilizar las AgNp y CuNp sobre distintos sustratos para el tratamiento de aguas contaminadas con microorganismos.